

## CYP2B6遺伝子多型によるバリエーション酵素の機能変化に関する研究

著者	渡邊 卓嗣
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18626号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00125885">http://hdl.handle.net/10097/00125885</a>

博士論文

*CYP2B6* 遺伝子多型による  
バリエーション酵素の機能変化に関する研究

平成 30 年度  
東北大学大学院薬学研究科  
生命薬科学専攻

渡邊 卓嗣

## 略語表

本文中及び図表中に次の略語を用いた。

3D	Three dimensional
7-ETC	7-Ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin
7-HTC	7-Hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin
8-HEZ	8-Hydroxyefavirenz
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
CO	Carbon monoxide
DMDC	decacarbonyldimanganese
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EFZ	Efavirenz
EtBr	Ethidium bromide
FBS	Fetal bovine serum
G-6-P	D-glucose-6-phosphate
G-6-PDH	D-glucose-6-phosphate dehydrogenase
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
I.S.	Internal standard
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LED	Light emitting diode
$\beta$ -NADP <sup>+</sup>	$\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADPH	$\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced
P450	Cytochrome P450
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidene difluoride
S.D.	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SDM	Site-directed mutagenesis
SNV	Single nucleotide variant
SRS	Substrate recognition site
TAE	Tris acetate EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA buffer
ToMMo	Tohoku Medical Megabank Organization
TOP10	One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride
Tween 20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
UV	Ultraviolet
WGS	Whole-genome sequences
XL10-Gold	XL10-Gold Ultracompetent Cell

## 目次

### *CYP2B6* 遺伝子多型によるバリエント酵素の機能変化に関する研究

第一節 序論	1
第二節 新規 <i>CYP2B6</i> 遺伝子多型の確認	8
第三節 <i>CYP2B6</i> バリエント発現クローンの作製	10
第四節 ヒト胎児腎臓由来 293FT 細胞を用いた <i>CYP2B6</i> バリエントの発現	20
第五節 ヒト胎児腎臓由来 293FT 細胞発現 <i>CYP2B6</i> バリエントの定量	23
第六節 EFZ を用いた <i>CYP2B6</i> バリエントの酵素反応速度論的解析	28
第七節 <i>CYP2B6</i> バリエントの酵素機能変化に対する基質特異性評価	34
第八節 <i>CYP2B6</i> バリエントの 3D ドッキングシミュレーションモデル解析	40
第九節 考察	64
総括	70
実験材料	72
実験方法	78
謝辞	89
参考文献	91
発表論文	103

## 第一節 序論

現在、臨床現場において薬剤師は、患者指向型の包括的医療支援を念頭に置いたファーマシューティカルケア遂行のための職能発揮が期待されている。患者個々に見合った薬物療法実践のため、薬学の専門的知見に基づいた薬剤選択や投与量調節の助言・提案が必要とされ、さらに医薬品投与後の副作用モニタリングをはじめとするフォローアップが求められる。治療効果や副作用発現の予測精度を高めた個別化薬物療法を提供するためには、腎機能をはじめとする従来の臨床検査指標に加え、個人間のさらなる医薬品反応性の違いを明らかにする必要がある。この医薬品反応性の違いには、食事や喫煙などの生活習慣や環境化学物質への暴露といった外的要因と共に、年齢や性別、人種などの内的要因が挙げられ、その中でも遺伝的要因が重要視されている[1, 2]。標準的な投与量にもかかわらず、重篤な副作用が発現し治療断念せざるを得ない患者が存在し、個人間の遺伝的性質の違いが医薬品の体内動態に大きく影響することが数多く報告されてきた[3-8]。このような医薬品の作用と患者個人の遺伝的性質の関連性を明らかにすべく、これまでに多くのゲノム薬理学 (Pharmacogenomics; PGx) 研究が進められている。この PGx 研究の発展により、近年、グルクロン酸転位酵素 (Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase; UGT) 1A1 遺伝子多型解析による投与量調節がイリノテカン塩酸塩を用いたがん治療のスタンダードとなっている。また、抗凝固薬であるワルファリンをはじめとする 20 種類以上の医薬品では、添付文書中に遺伝子多型を考慮した投与量に関する記述がみられる。しかし、遺伝子情報を活用した薬物療法の臨床応用は特定の患者にしか行われておらず、全患者的な個別化薬物療法の実現と普及にはさらなる PGx 研究によるエビデンス創出が必要と考えられる。

薬物代謝を担う酵素の主要なものとしてチトクローム P450 (Cytochrome P450; P450) が挙げられ、医薬品反応性の違いに大きく関与していることが明らかとなっている。この分子群の遺伝的多型性と医薬品体内動態の変動や薬効・副作用発現との関連性について多くの研究が行われており、遺伝子配列のわずかな差異に由来する酵素機能変化が報告されてきた[9-11]。P450 には複数の分子種が存在し、水酸化反応をはじめ様々な薬物の解毒・代謝活性化に中心的な役割を担って

いる[12-16]。その中でもチトクローム P450 2B6 (Cytochrome P450 2B6; CYP2B6) は、シクロホスファミドなどの抗悪性腫瘍薬、エファビレンツ (EFZ) やネビラピンなどの抗 HIV 薬、抗うつ薬や禁煙補助薬として使用されているブプロピオンなどその他多くの薬剤、環境化学物質の代謝に関与している[17-22]。CYP2B6 遺伝子は、第 19 番染色体上に位置し、9 個のエキソンから構成されている[23]。その遺伝子より翻訳される CYP2B6 は肝臓に多く、脳や肺、皮膚、神経においてもその発現が確認されており、汎用されている医薬品の約 7% の代謝反応を触媒していると考えられている[24, 25]。CYP2B6 による薬物代謝活性の個人差についても遺伝子多型が大きく影響し、薬効の減弱や副作用発現のリスク増大に関与していることが明らかとなっている[11]。CYP2B6 遺伝子は、P450 分子種の中でも多型性に富んでおり、Pharmacogene Variation Consortium website (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2B6>) において、現在までに 37 種類のバリエントアレルが報告されている。また、これまでに、数多くの *in vivo* 及び *in vitro* における CYP2B6 遺伝子多型に関する研究が行われており、薬物代謝活性への影響が示されている[26]。

CYP2B6 遺伝子多型に伴う酵素機能変化は、薬物動態のような表現型に大きく影響することが多数報告されている[26]。血中薬物濃度の変化のみならず、薬効や治療継続の可否、副作用発現リスク、再発率、生存率等に至るまで、多くの関連性が示唆されている。特に、欧米やアフリカ、アジア諸国など様々な人種や民族集団で高頻度に同定される CYP2B6\*6 バリエントアレルについては、多くの臨床研究が行われており、CYP2B6 遺伝子多型が薬物代謝活性に及ぼす影響が明らかとなってきた[26]。CYP2B6\*6 バリエントアレルをホモ接合体で有するヒトは、ヘテロ接合体あるいは遺伝子多型を有さないヒトと比較して、EFZ の血中濃度が上昇し、副作用発現及び AIDS 治療断念のリスクが増大するという報告があり[27-31]、遺伝子多型を考慮した EFZ 投与量の調節が抗 HIV 薬の適正使用に繋がることも報告された[32-34]。同様に、離脱療法でメサドン塩酸塩を使用するヘロイン中毒患者においては、メサドンの血中濃度が著しく増加することから、CYP2B6\*6 の有無によって投与量の調節が必要であることが示唆されている[35, 36]。また、プロドラッグであるシクロホスファミドを用いたがん化学療法施行患者に対して、CYP2B6 遺伝子型と表現型の関連性が複数報告されている[37-40]。その中でも、欧米人で高頻度に同定される

*CYP2B6*\*5 バリエントアレルをヘテロ接合体で有する悪性リンパ腫の患者群において[41]、造血幹細胞移植後の維持治療でシクロホスファミドを投与した場合、野生型 *CYP2B6* を有する患者群と比較して、有意な再発率の増加及び全生存率の低下が認められた[42, 43]。その他、ブプロピオンや全身麻酔薬ケタミン塩酸塩においても、*CYP2B6* 遺伝子多型によって薬物体内動態が変化することが示唆されている[44-47]。このように、様々な薬物療法において *CYP2B6* 遺伝子多型が表現型に影響することが明らかとなり、従来よりも効果的かつ安全な薬物療法を行うためには、患者個々の遺伝子多型情報の把握が極めて有益であると考えられる。

遺伝子多型に由来する *CYP2B6* バリエント酵素機能変化の解明を目的に、現在まで多くの *in vitro* 実験が行われている。特に、哺乳動物細胞を用いた cDNA による組換えタンパク質発現実験において、Jinno らは 6 種類のバリエントアレル (*CYP2B6*\*2–*CYP2B6*\*7) に対し、アフリカミドリザル腎臓由来細胞株 COS-1 細胞発現系を構築し 7-Ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin (7-ETC) *O*-脱エチル化活性を測定することで遺伝子多型に由来する *CYP2B6* バリエント酵素の機能変化を評価している[48]。同様に Radloff らは EFZ 及びブプロピオンを、Crane らは有機リン系殺虫剤クロルピリホスを基質薬物として、COS-1 細胞発現 *CYP2B6* による遺伝子多型機能評価を行っている[49, 50]。さらに、先行研究において我々は 26 種類のバリエント酵素に対し、COS-7 細胞を用いて酵素反応速度論的解析を行い、同一実験系での網羅的な解析を行った[51, 52]。これら遺伝子多型に由来する *CYP2B6* バリエントの中には、酵素機能が完全に消失するタイプが明らかとなっており、アフリカ集団で高頻度に検出される *CYP2B6*\*18 や日本人で同定された *CYP2B6*\*24 がその一例として挙げられる[53-55]。しかしながら、*in vitro* 試験における *CYP2B6* 遺伝子多型解析は、異なる基質薬物や組換えタンパク質発現系を使用していることから、それぞれの研究グループ間で一貫した結果が得られていない。また *CYP2B6* の場合、その豊富な遺伝的多型性であるが故に低頻度遺伝子多型は見過ごされ、機能変化未解明なバリエントも多く存在する一方で、高頻度に検出されるものや民族集団特異的な遺伝子多型のみ解析が進んでいる状況にある。したがって、*CYP2B6* 遺伝子多型の薬物代謝活性に及ぼす影響について、その明確な見解は乏しく臨床医療に十分に応用されるには至っていない。



最近、東北大学・東北メディカル・メガバンク機構 (Tohoku Medical Megabank Organization; ToMMo) における日本人集団 1,070 人を対象とした大規模全ゲノム配列解析 (whole-genome sequences; WGS) が実施された。公開された塩基配列データベースにおける CYP2B6 の遺伝子多型情報から、これまでに報告されていないアミノ酸置換を伴う 7 種類の遺伝子多型が抽出された [56]。これらの遺伝子多型は、これまで日本人集団において低頻度であるが故に見落とされてきたものであり、酵素機能変化の程度も未解明である。CYP2B6 で代謝される医薬品の治療効果や副作用発現の予測精度を向上させるためには、このような日本人集団に存在する低頻度遺伝子多型、いわゆるレアバリエントに由来する酵素タンパク質の機能変化の解明が必須であると考えられる。今後さらに、新規のレアバリエントが報告されてくることが予想され、その中には酵素機能に重大な影響を及ぼすバリエントが存在する可能性が考えられる。

CYP2B6 で代謝される医薬品に対し遺伝子多型を考慮した薬物療法を提供し臨床医療に応用するためには、アレルト異的なバリエント酵素機能変化情報の蓄積と情報基盤構築が必要と考えられる。そこで本研究では、39 種類のアミノ酸置換を伴うバリエントアレル (CYP2B6\*2–CYP2B6\*21、CYP2B6\*23–CYP2B6\*28、CYP2B6\*31–CYP2B6\*35、CYP2B6\*37 及び 7 種類のレアバリエント) (Table 1) に対し、*in vitro* 試験による解析技術を構築し、網羅的な酵素機能変化の解明を試みた。野生型アレル CYP2B6\*1 から翻訳される CYP2B6.1 タンパク質及び 39 種類の CYP2B6 バリエントアレルから翻訳される各 CYP2B6 バリエントタンパク質を同一条件のもとヒト胎児腎臓由来細胞株 293FT 細胞で発現させ、CYP2B6 タンパク質発現量を測定した。酵素活性測定については、CYP2B6 が主要な代謝に関与し、多くの国で使用されている抗 HIV 薬 EFZ を基質薬物として用い [57-59]、酵素反応速度論的解析によりミカエリス定数 ( $K_m$ )、最大反応速度 ( $V_{max}$ ) 及び固有クリアランス ( $CL_{int} = V_{max}/K_m$ ) を算出し、酵素機能変化を評価した。さらに、*in vitro* 試験における CYP2B6 の酵素活性プローブ薬である 7-ETC を用いて EFZ 同様に酵素反応速度論的解析を行い [59-61]、各 CYP2B6 バリエントで EFZ と 7-ETC 代謝活性の変化に基質特異性が存在するか否かを評価した。これらの酵素反応速度論的解析は還元型一酸化炭素吸収 (Carbon monoxide; CO) 差スペクトル測定によるホロ P450 含量で補正し、機能タンパク質自体の酵素機能変化を評価した。さらに、それ

ぞれのアミノ酸置換に対し三次元 (Three dimensional; 3D) ドッキングシミュレーションモデル解析を行い、酵素機能変化の分子メカニズム解明を試みた。これらの酵素機能評価により、これまで未解明であったアミノ酸置換を伴う CYP2B6 バリエントの薬物代謝への影響が網羅的に明らかになるものと考えられる。本研究で構築した解析技術は、バリエント酵素機能変化の一貫した評価・比較を可能とし、*CYP2B6* 遺伝子多型の機能解析技術基盤構築に繋がることが期待される。さらに本研究の機能変化情報は、CYP2B6 で代謝される医薬品の遺伝子型と表現型の関連性を明らかにするための情報基盤になるものと考えられる。

**Table 1.** CYP2B6 allelic variants characterized in this study.

Variants	Protein	Nucleotide changes	Amino acid substitution
<i>CYP2B6*1</i>	CYP2B6.1		
<i>CYP2B6*2</i>	CYP2B6.2	64C>T	Arg22Cys
<i>CYP2B6*3</i>	CYP2B6.3	777C>A	Ser259Arg
<i>CYP2B6*4</i>	CYP2B6.4	785A>G	Lys262Arg
<i>CYP2B6*5</i>	CYP2B6.5	1459C>T	Arg487Cys
<i>CYP2B6*6</i>	CYP2B6.6	516G>T; 785A>G	Gln172His; Lys262Arg
<i>CYP2B6*7</i>	CYP2B6.7	516G>T; 785A>G; 1459C>T	Gln172His; Lys262Arg; Arg487Cys
<i>CYP2B6*8</i>	CYP2B6.8	415A>G	Lys139Gln
<i>CYP2B6*9</i>	CYP2B6.9	516G>T	Gln172His
<i>CYP2B6*10</i>	CYP2B6.10	62A>T; 64C>T; 216G>T	Gln21Leu; Arg22Cys
<i>CYP2B6*11</i>	CYP2B6.11	136A>G	Met46Val
<i>CYP2B6*12</i>	CYP2B6.12	296G>A	Gly99Glu
<i>CYP2B6*13</i>	CYP2B6.13	415A>G; 516G>T; 785A>G	Lys139Gln; Gln172His; Lys262Arg
<i>CYP2B6*14</i>	CYP2B6.14	419G>A	Arg140Gln
<i>CYP2B6*15</i>	CYP2B6.15	1172T>A	Ile391Asn
<i>CYP2B6*16</i>	CYP2B6.16	785A>G; 983T>C	Lys262Arg; Ile328Thr
<i>CYP2B6*17</i>	CYP2B6.17	76A>T; 83A>G; 85T>A; 86G>C	Thr26Ser; Asp28Gly; Arg29Thr
<i>CYP2B6*18</i>	CYP2B6.18	983T>C	Ile328Thr
<i>CYP2B6*19</i>	CYP2B6.19	516G>T; 785A>G; 1006C>T	Gln172His; Lys262Arg; Arg336Cys
<i>CYP2B6*20</i>	CYP2B6.20	503C>T; 516G>T; 785A>G	Thr168Ile; Gln172His; Lys262Arg
<i>CYP2B6*21</i>	CYP2B6.21	1282C>A	Pro428Thr
<i>CYP2B6*23</i>	CYP2B6.23	1375A>G	Met459Val
<i>CYP2B6*24</i>	CYP2B6.24	1427G>A	Gly476Asp

<i>CYP2B6*25</i>	CYP2B6.25	1454A>T	Gln485Leu
<i>CYP2B6*26</i>	CYP2B6.26	499C>G; 516G>T; 785A>G	Pro167Ala; Gln172His; Lys262Arg
<i>CYP2B6*27</i>	CYP2B6.27	593T>C	Met198Thr
<i>CYP2B6*28</i>		917C>G; 1132C>T	Thr306Ser; Arg378Ter
<i>CYP2B6*31</i>	CYP2B6.31	937C>A	Leu313Ile
<i>CYP2B6*32</i>	CYP2B6.32	1219G>A	Ala407Thr
<i>CYP2B6*33</i>	CYP2B6.33	1459C>A	Arg487Ser
<i>CYP2B6*34</i>	CYP2B6.34	516G>T; 785A>G; 1459C>A	Gln172His; Lys262Arg; Arg487Ser
<i>CYP2B6*35</i>	CYP2B6.35	329G>T; 341T>C; 444G>T; 593T>C; 835G>C	Gln110Val; Ile114Thr; Glu148Asp; Met198Thr; Ala279Pro
<i>CYP2B6*37</i>	CYP2B6.37	516G>T; 548T>G; 785A>G	Gln172His; Val183Gly; Lys262Arg
Novel variant 1		103C>T	Arg35Cys
Novel variant 2		433C>T	Arg145Trp
Novel variant 3		472C>G	Arg158Gly
Novel variant 4		1017G>C	Glu339Asp
Novel variant 5		1138T>C	Tyr380His
Novel variant 6		1145T>A	Ile382Asn
Novel variant 7		1327C>T	Arg443Cys

---

## 第二節 新規 *CYP2B6* 遺伝子多型の確認

ToMMo が実施した日本人 1,070 人の WGS では、次世代シーケンサーによる解析が行われた。そこで、シーケンス解析のエラーによる偽陽性の可能性を排除するために、新規に同定された 7 種類の *CYP2B6* 遺伝子多型についてサンガーシーケンス法によるリシーケンスを行った。各遺伝子多型を有する被検者の末梢血白血球由来 DNA に対して、*CYP2B6* 遺伝子の各エキソン領域に特異的なプライマーセットを用いて PCR 増幅し、サンガーシーケンス法により塩基配列を解析した。用いたプライマー配列は Table 2 に示した。これにより、WGS で得られた遺伝子多型と今回のサンガーシーケンス解析結果が一致することを確認し、1,070 人の日本人集団において 7 種類の低頻度遺伝子多型（レアバリエント）が同定されたことを再確認した (Fig. 1)。

**Table 2.** PCR primers used to amplify sequences of the human *CYP2B6* gene to confirm the novel allelic variants observed in 1,070 Japanese subjects.

Nucleotide change	Primer (5'–3')		Product length (bp)
	Forward	Reverse	
103C>T	GTGCAGGGCAGTCAGACCAG	CAAGGCAAGAAGCAGCTCAC	243
433C>T	CAGGTGTGATCTTTGCCAATG	GATGGTGTCTCCAGTTTCGTC	280
472C>G			
1017G>C	CCACCTCAACCTCCAAAATTG	GATATTGCCATTCCCTCCAAC	454
1138T>C			
1145T>A			
1327C>T	GCAGTGGACATTTGTGTCTGG	CTCACTTGCAATGTGACCTCAG	441

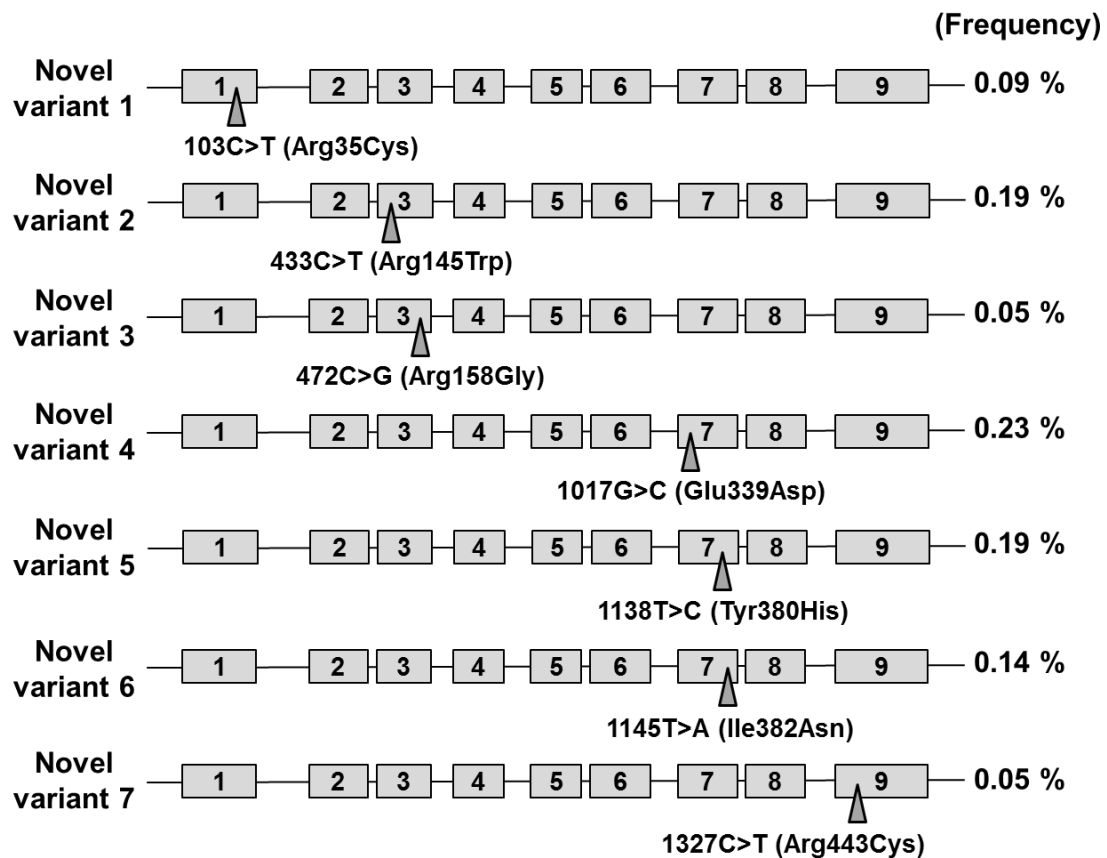


Fig. 1. Seven novel CYP2B6 SNVs identified in 1,070 Japanese subjects. The shaded box numbers correspond to each CYP2B6 exon. The frequencies of the CYP2B6 variants in the diagram were observed in 1,070 Japanese subjects.

### 第三節 *CYP2B6* バリエント発現クローンの作製

#### 3-1. バリエント型 *CYP2B6* エントリークローンの作製

*CYP2B6*\*1-*\*21*、*\*23*-*\*28* に関して、先行研究において作製した発現プラスミド (pcDNA3.1) を鋳型として、*CYP2B6* バリエントの cDNA を特異的に PCR 増幅した[62]。用いたプライマーは Table 3 に示した。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動後、UV 照射により確認した (Fig. 2)。次に PCR 産物をカラム精製し、クローニング用ベクター (pENTR/D-TOPO) にライゲーション後、コンピテントセル (XL10-Gold) にトランスフォーメーションし、カナマイシン含有 LB 寒天プレートで培養した。

**Table 3.** Primers used for *CYP2B6* cDNA cloning.

Primer name	Sequence (5'-3')
Forward primer	CACCATGGAACCTCAGCGTCCTCCTC
Reverse primer	TCAGCGGGGCAGGAAGC

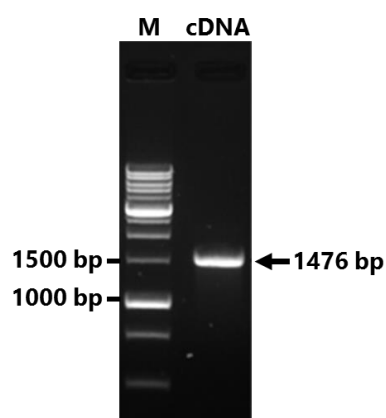


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the PCR amplicon of *CYP2B6* cDNA. The amplification size of *CYP2B6* cDNA resulted in 1476 bp. M: DNA marker, cDNA: *CYP2B6* amplicon.

先行研究以降新規に同定された *CYP2B6*\*31-*\*35*、*\*37* 及び 7 種類のレアバリエントについては、野生型である *CYP2B6*\*1 の cDNA 配列が挿入されたクローニング用ベクター (pENTR/D-TOPO 中に挿入) をもとに、各種塩基多型を導入することでバリエント型 *CYP2B6* エントリークローンの作製を行った。塩基多型の導入は、部位特異的組み換え反応 (site-directed mutagenesis; SDM) 法にて Fig. 3 の順序で行い、Table 4 のプライマーを用いた。得られた PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動後 UV 照射により確認し、XL10-Gold へのトランスフォーメーション後、カナマイシン含有 LB 寒天プレートで培養した。なお、全てのバリエント型 *CYP2B6* エントリークローンはサンガーシーケンス法により塩基多型の導入を確認した (Fig.4)。

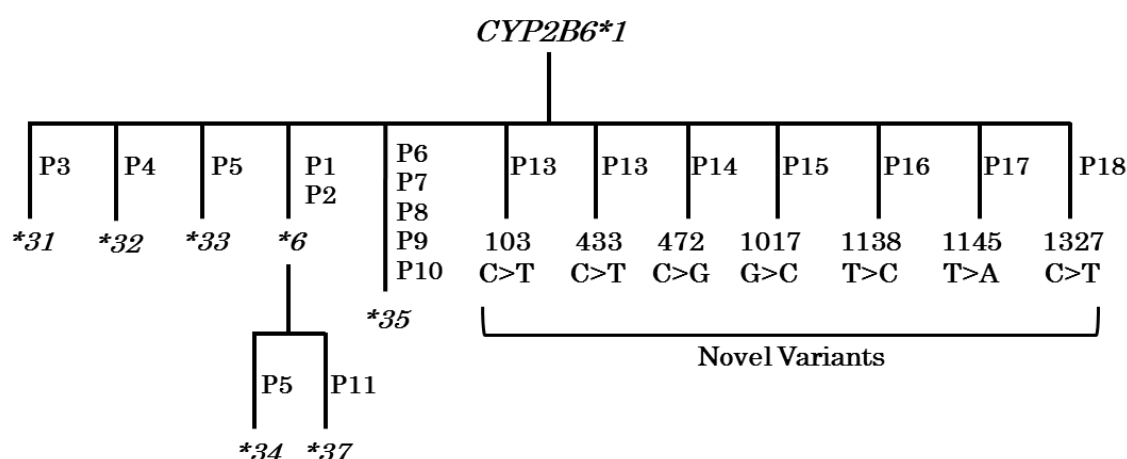


Fig. 3. Schematic view of the protocol for the site-directed mutagenesis.

Variant number (\*No.) indicates entry clones which contains sequence of the *CYP2B6* allelic variant sequence. Generations of variant *CYP2B6* constructs were performed with the site-directed mutagenesis method. Primer number (P1–P18) corresponds with Table 4.



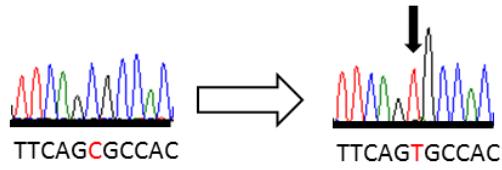
**Table 4.** Primers used for site-directed mutagenesis.

Primer No.	Amino acid change	Nucleotide change	Forward primer (5′–3′)	Reverse primer (5′–3′)
P1	Q172H	516G>T	GACCCACCTTCCTCTTCCATTCCATTACCGC	GCGGTAATGGAAGAGGAGGTGGGGTC
P2	K262R	785A>G	CCCAGCGCCCCCAGGGACCTCATCG	CGATGAGGTCCCTGGGGGCGCTGGG
P3	L313I	937C>A	CCGCTACGGCTTCCTGATCATGCTCAAATACCC	GGGTATTTGAGCATGATCAGGAAGCCGTAGCGG
P4	A407T	1219G>A	CTACTTTGAAAAACCAGACACCTTCAATCCTGACCACTT	AAGTGGTCAGGATTGAAGGTGTCTGGTTTTTCAAAGTAG
P5	R487S	1459C>A	GCGGGGCAGGAAGCTGATCTGGTATGTTG	CAACATACCAGATCAGCTTCCTGCCCCGC
P6	Q110V	329G>T	CAAAGGTCACACCATATACCCGGAAGAATGGGTCG	CGACCCATTCTTCCGGGTATATGGTGTGACCTTTG
P7	I114T	341T>C	GGTTTCCATTGGCAAAGGTCACACCATATCCCCGG	CCGGGGATATGGTGTGACCTTTGCCAATGGAAACC
P8	E148D	444G>T	CAGACACTGAGCCTCATCCTGAATCCGCTCC	GGAGCGGATTCAGGATGAGGCTCAGTGTCTG
P9	M198T	593T>C	GGTAGAACAAGTTCAGCGTCTTCAGGAACTCTTGATCTTG	CAAGATCAAGAGTTCCTGAAGACGCTGAACTTGTTCTACC
P10	A279P	835G>C	GGCTGAATTCAGTGTGTGGGTTGGATTTCTCTTTTTTC	GAAAAAGAGAAATCCAACCCACACAGTGAATTCAGCC
P11	V183G	548T>G	GGAATCGTTTTCCAAAGCCGATGGAGCAGATGATG	CATCATCTGCTCCATCGGCTTTGGAAAACGATTCC
P12	R35C	103C>T	GGGCAGAGGGCAGGGCCCTGGTG	CACCAGGGCCCTGCCCTCTGCCC

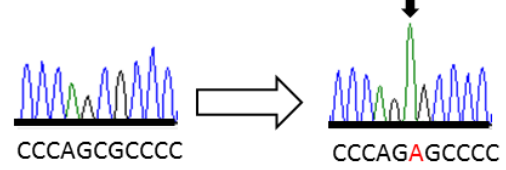
P13	R145W	433C>T	CTCCTCCTGAATCCACTCCTCCACACTCC	GGAGTGTGGAGGAGTGGATTTCAGGAGGAG
P14	R158G	472C>G	CCCCTTGGATTTCCCAAGCTCCTCTATCAGACAC	GTGTCTGATAGAGGAGCTTGGGAAATCCAAGGGG
P15	E339D	1017G>C	GCTCGGTCATGAAGGTCTGGAGGGCGATG	CATCGCCCTCCAGACCTTCATGACCGAGC
P16	Y380H	1135T>C	CTTGGGGATGATGTGCCCTCGGAAGCTGG	CCAGCTTCCGAGGGCACATCATCCCCAAG
P17	I382N	1145T>A	GTCCTTGGGGTTGATGTACCCTCGGAAGCT	AGCTTCCGAGGGTACATCAACCCCAAGGAC
P18	R443C	1327C>T	GGAACAATTCCGCACAGGCGATGCCTTCACC	GGTGAAGGCATCGCCTGTGCGGAATTGTTCC

---

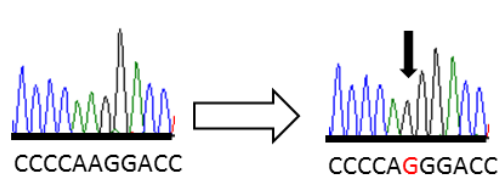
\*2 [64C>T]



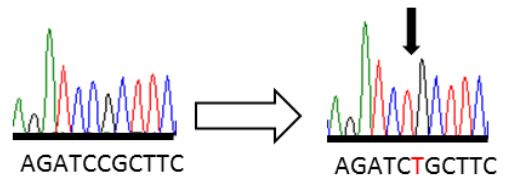
\*3 [777C>A]



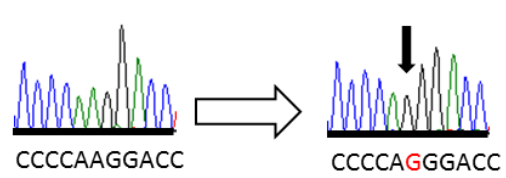
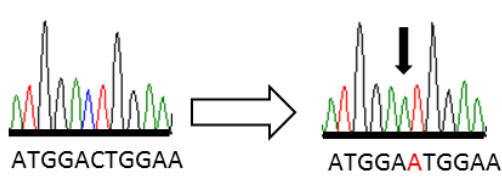
\*4 [785A>G]



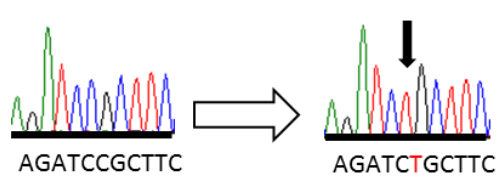
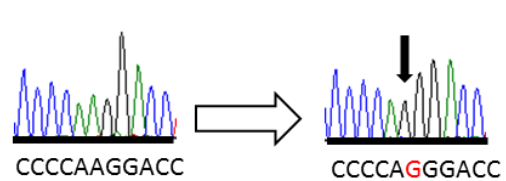
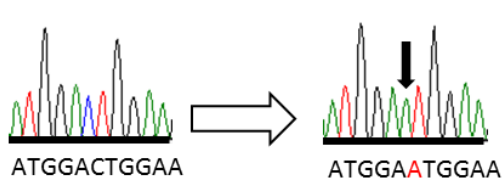
\*5 [1459C>T]



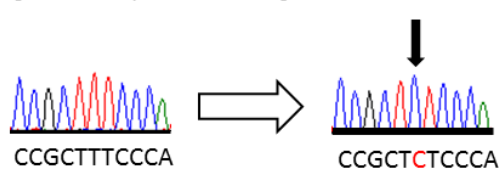
\*6 [516G>T(antisense), 785A>G]



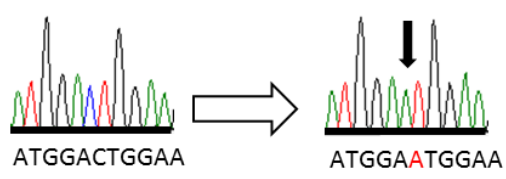
\*7 [516G>T(antisense), 785A>G, 1459C>T]



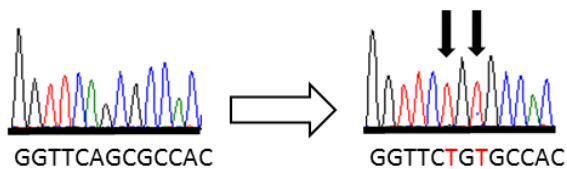
\*8 [415A>G, antisense]



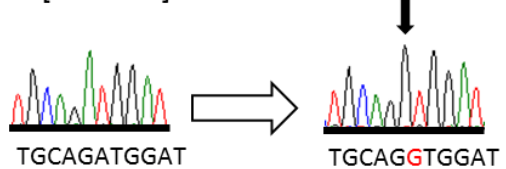
\*9 [516G>T, antisense]



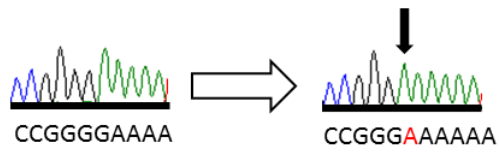
\*10 [62A>T, 64C>T]



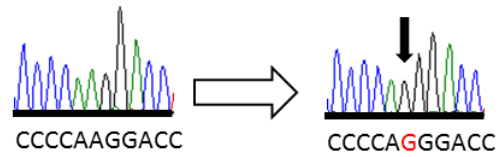
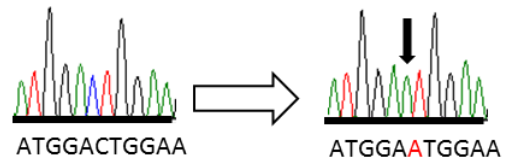
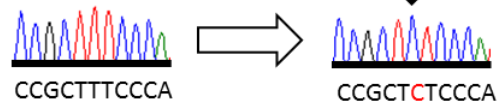
\*11 [136A>G]



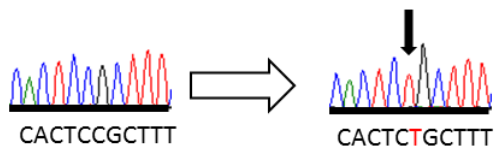
\*12 [296G>A, antisense]



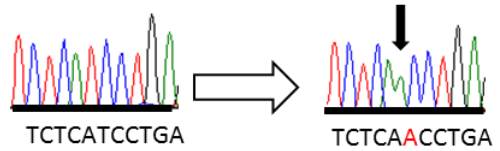
\*13 [415A>G (antisense),  
516G>T (antisense), 785A>G]



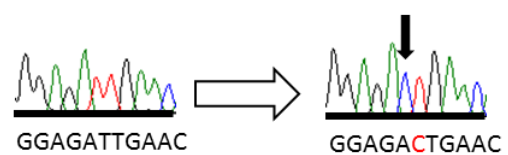
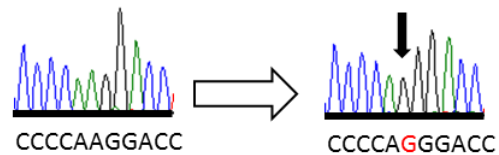
\*14 [419G>A, antisense]



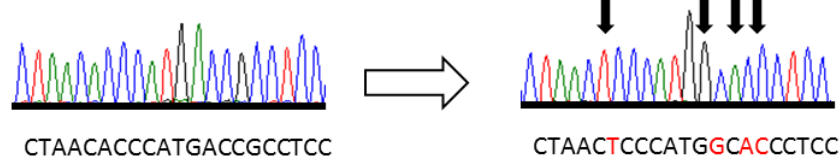
\*15 [1172T>A]



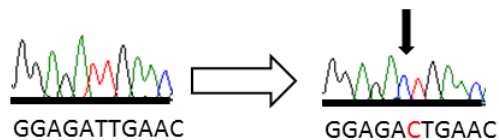
\*16 [785A>G, 983T>C]



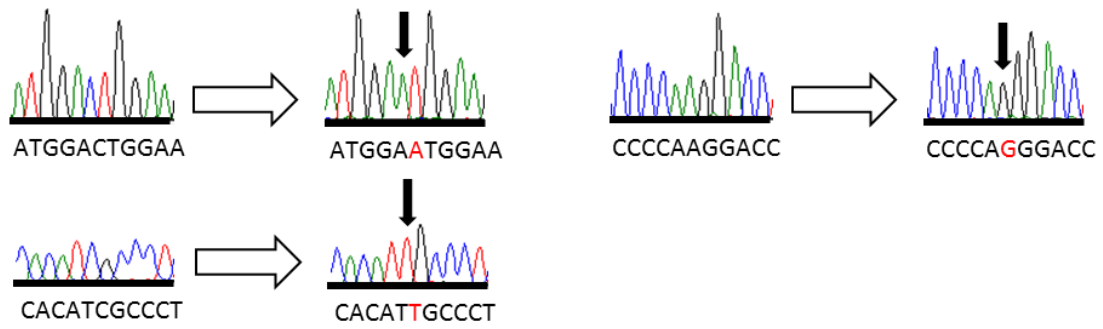
\*17 [76A>T, 83A>G, 85C>A, 86G>C]



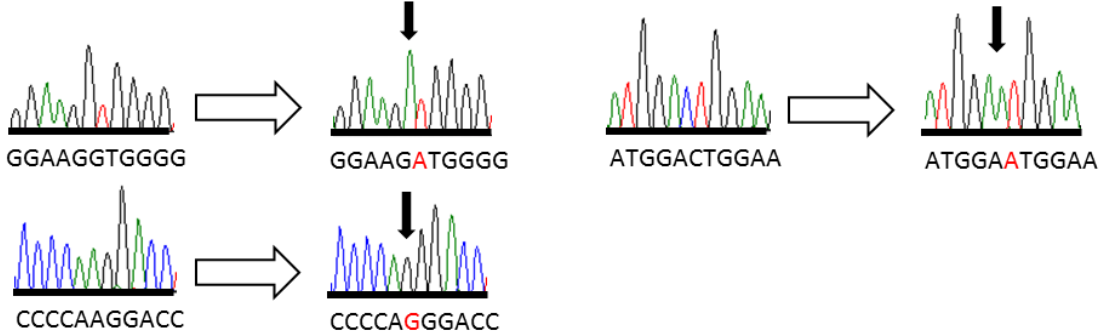
\*18 [983C>T]



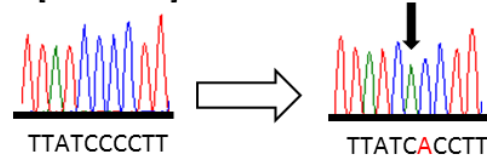
\*19 [516G>T(antisense), 785A>G, 1006C>T]



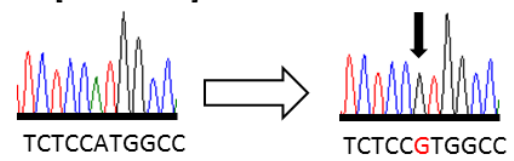
\*20 [503C>T (antisense),  
516G>T (antisense), 785A>G]



\*21 [1282C>A]



\*23 [1375A>G]



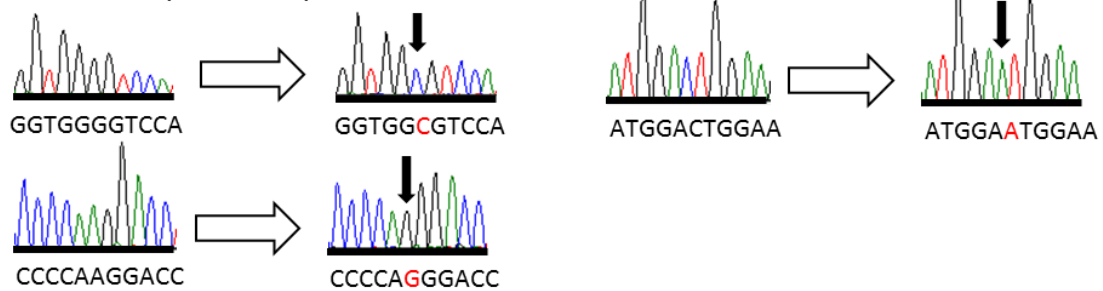
\*24 [1427G>A]



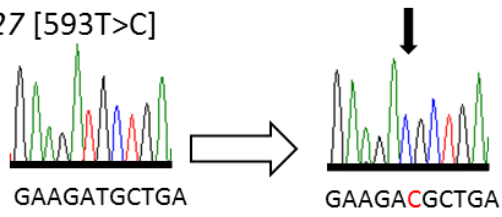
\*25 [1454A>T]



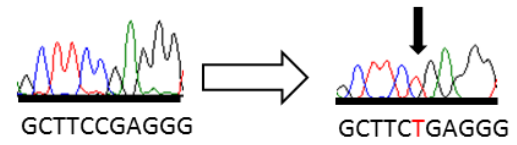
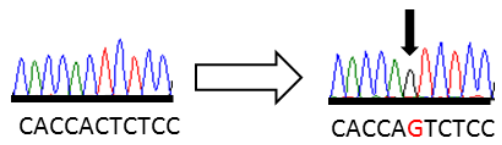
\*26 [499C>G (antisense),  
516G>T (antisense), 785A>G]



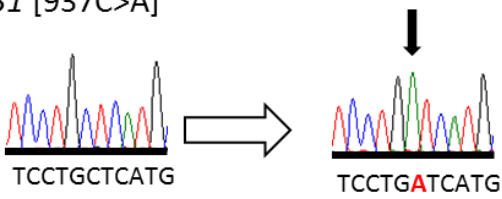
\*27 [593T>C]



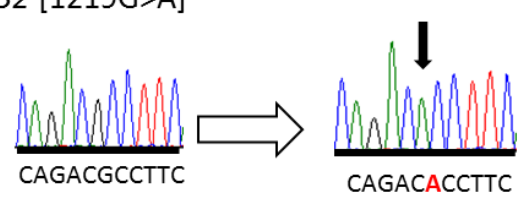
\*28 [917C>G, 1132C>T]



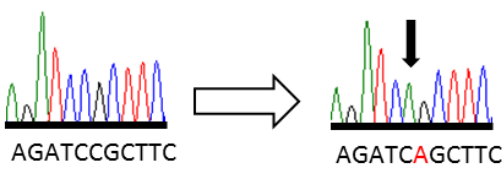
\*31 [937C>A]



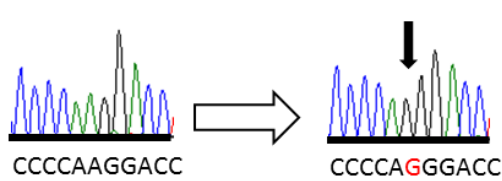
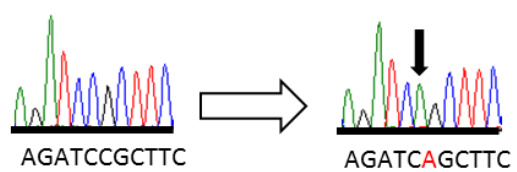
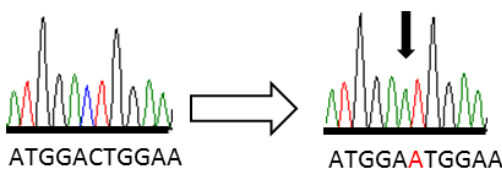
\*32 [1219G>A]



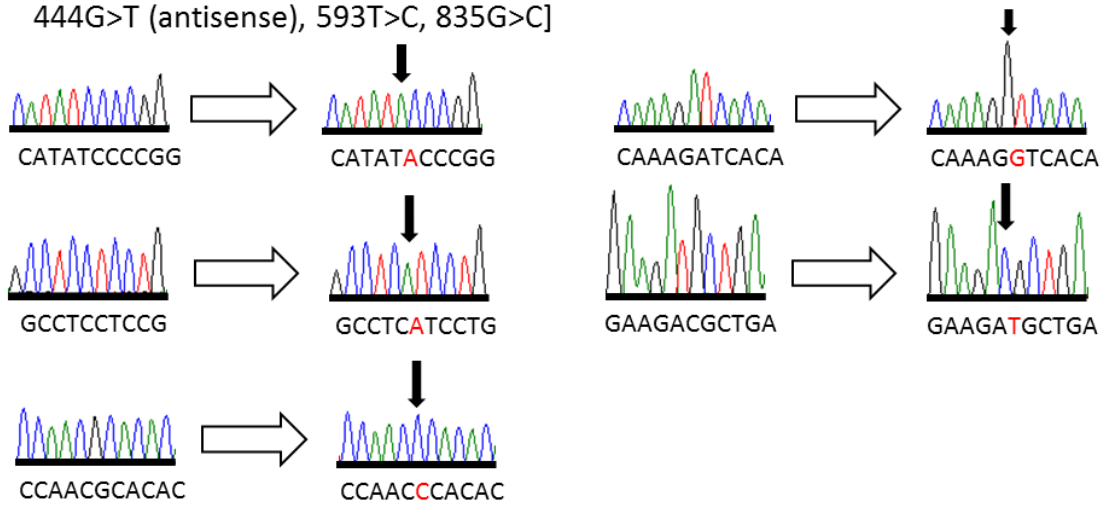
\*33 [1459C>A]



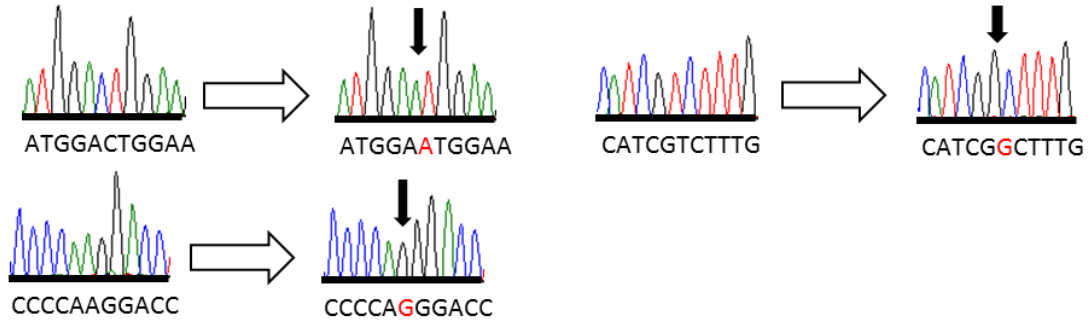
\*34 [516G>T (antisense), 785A>G  
1459C>A]



\*35 [329G>T (antisense), 341T>C (antisense),  
444G>T (antisense), 593T>C, 835G>C]



\*37 [516G>T (antisense),  
548T>G, 785A>G]



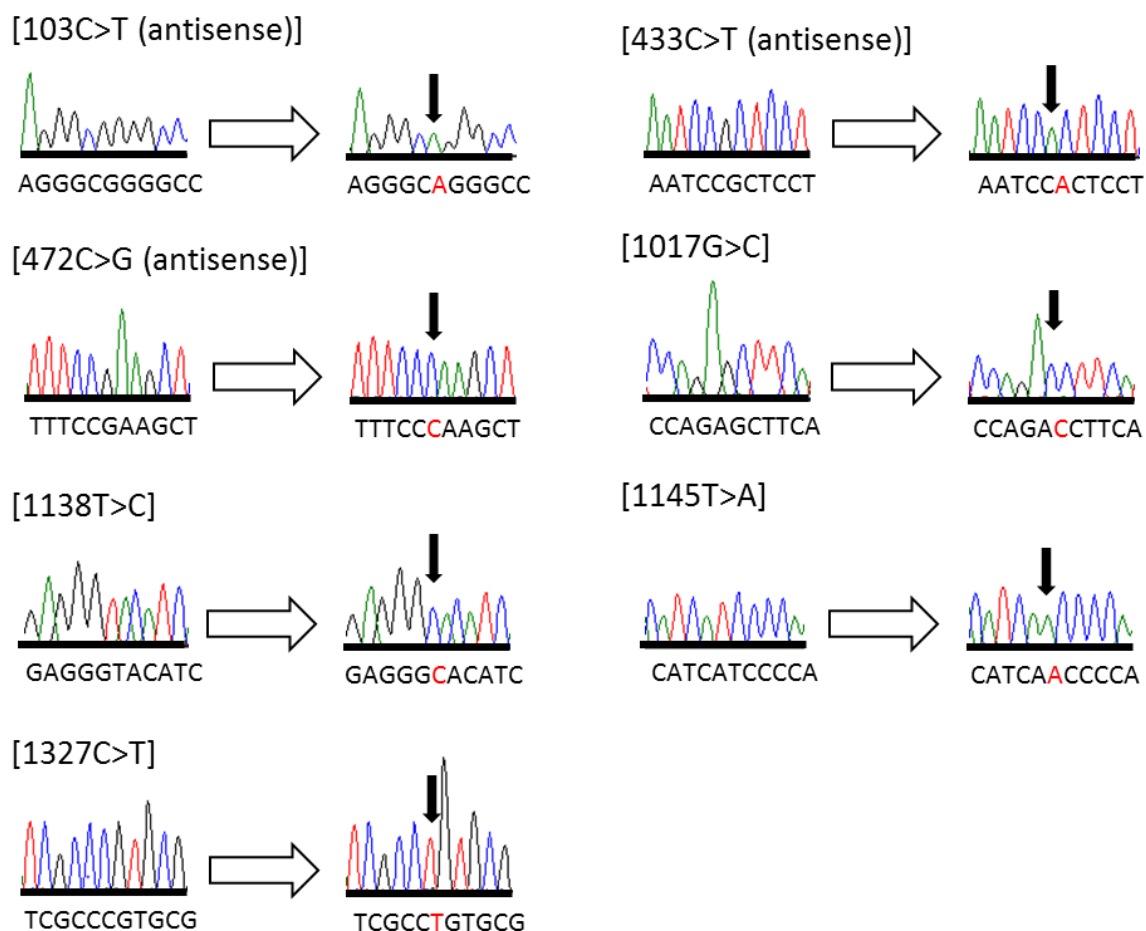


Fig. 4. Nucleotide changes of CYP2B6 cDNA by site-directed mutagenesis. Red markers indicate the position of the nucleotide change positions.

### 3-2. *CYP2B6* バリエント発現クローンの作製

得られた *CYP2B6* エントリークローンは Gateway システム (Invitrogen, Thermo Fisher scientific) を利用した LR 組み換え反応により、哺乳動物細胞発現ベクターである pcDNA3.4 に乗せ換えた。反応産物をコンピテントセル (TOP10) にトランスフォーメーションし、アンピシリン含有培地で培養した。SDM 法によって作製した *CYP2B6* バリエント発現クローンは、サンガーシーケンス法によりエントリーベクターから発現ベクターへ組み換えられていることを確認した。なお、LR 組み換え反応可能な pcDNA3.4 は当研究室の先行研究で作製したものをを用いた[63]。



#### 第四節 ヒト胎児腎臓由来 293FT 細胞株を用いた CYP2B6 バリエントの発現

293FT 細胞中に組換え野生型 CYP2B6 (CYP2B6.1) タンパク質を発現させた。方法は、70%以上コンフルエントの状態になった細胞にトランスフェクション法にて野生型 CYP2B6 発現プラスミド DNA を導入し、37°C で 24 時間培養した。回収した細胞から、遠心分離法によりミクロソーム画分を調製した。CYP2B6 の発現は、抗 CYP2B6 ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法により確認した。また、小胞体膜に恒常的に発現しているマーカータンパク質であるカルネキシン (約 90 kDa) をローディングコントロールとし、抗カルネキシン抗体を用いて、その発現を確認した。CYP2B6 を発現させた 293FT 細胞のミクロソーム画分中において、CYP2B6 分子量である 56 kDa 付近に抗 CYP2B6 抗体と特異的に反応するタンパク質が検出された (Fig. 5)。また、CYP2B6 の cDNA が挿入されていないコントロールベクター (mock) のみを導入した 293FT 細胞では、抗 CYP2B6 抗体と反応するタンパク質は認められなかった。CYP2B6 含有ミクロソーム画分及びコントロールミクロソーム画分において、カルネキシンの発光強度は同程度となり、ローディングによる誤差はほとんどないと判断した。

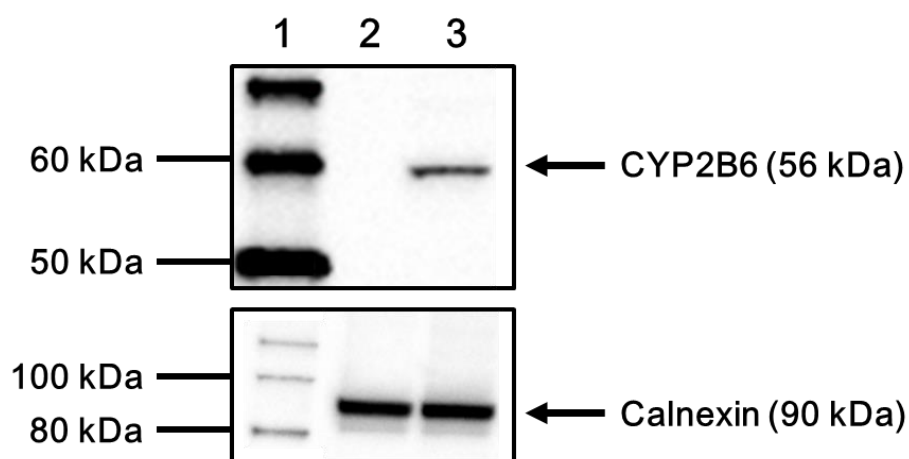


Fig. 5. Western blots showing immunoreactive CYP2B6 protein (upper panel) and calnexin (lower panel). Lane 1: molecular-weight marker, Lane 2: microsomal fraction from 293FT cells transfected with the control vector (mock), Lane 3: microsomal fraction from 293FT cells

CYP2B6.1 の発現と同様の方法により、293FT 細胞中に各 CYP2B6 バリエント (CYP2B6.2–CYP2B6.21、CYP2B6.23–CYP2B6.28、CYP2B6.31–CYP2B6.35、CYP2B6.37 及び 7 種類のレアバリエント) を発現させミクロソーム画分を調製後、抗 CYP2B6 抗体を用いたウェスタンブロット法により CYP2B6 発現タンパク質を確認した (Fig. 6)。CYP2B6\*28 に由来する Arg378Ter を除く全ての CYP2B6 バリエント酵素において、抗 CYP2B6 抗体と特異的に反応するタンパク質が 56 kDa 付近に検出された。なお、Arg378Ter は終止コドンへの塩基置換により、途中でタンパク質翻訳が停止してしまうため低分子量側にバンドが検出された。また、マーカートンパク質であるカルネキシンの検出を同時に行った結果、いずれの CYP2B6 バリエント発現時においても同程度の発光強度で検出されたため、ローディングによる誤差はほとんどないと判断した。

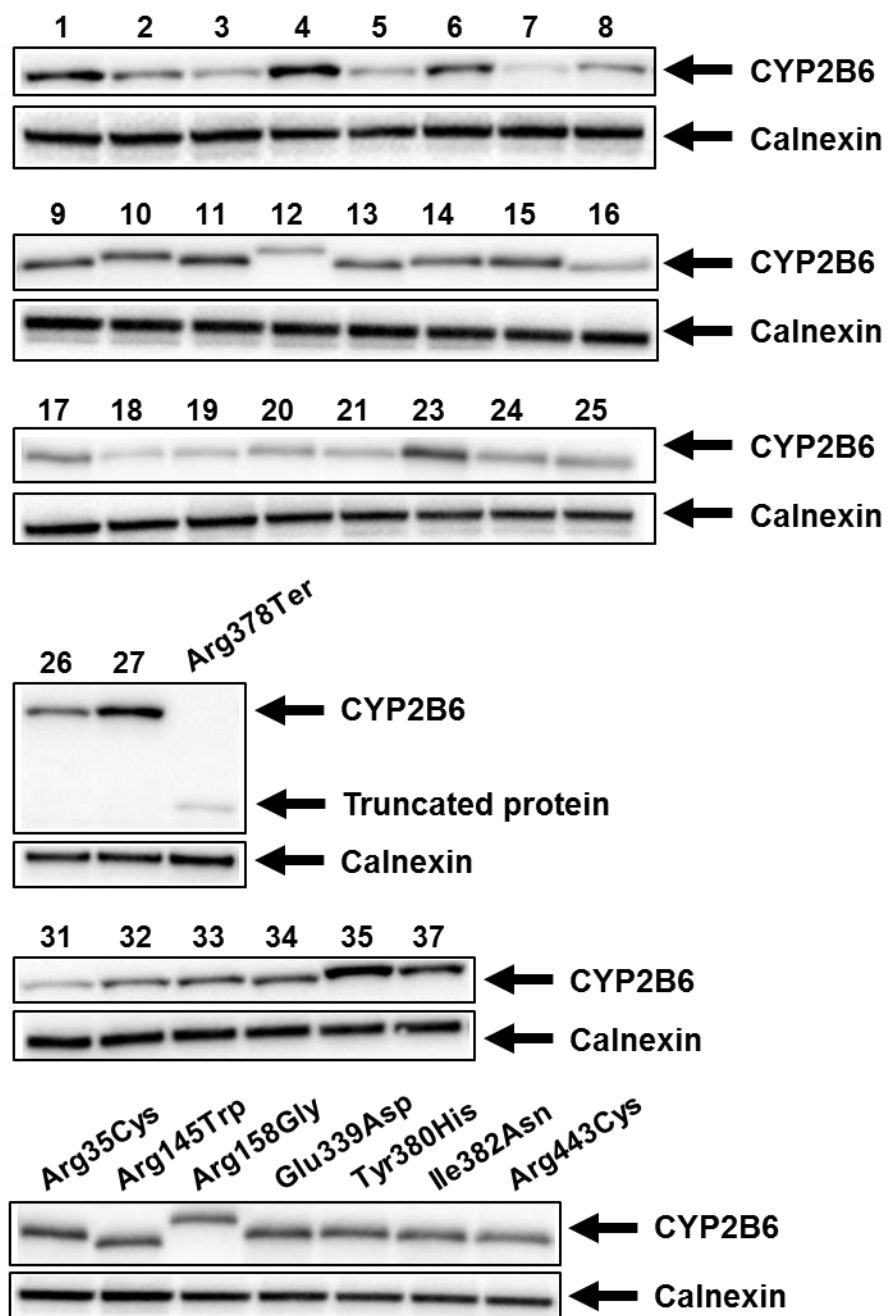


Fig. 6. Western blots showing immunoreactive CYP2B6 variant proteins (upper panel) and calnexin (lower panel). Immunoblotting was performed according to standard procedures using SDS-PAGE. The microsomal fractions of CYP2B6 variant proteins were loaded onto each lane by 5  $\mu$ g. CYP2B6 variant proteins were detected using polyclonal antibodies against CYP2B6, and calnexin was detected using polyclonal antibodies against calnexin. Numbers correspond to each CYP2B6 allele number.

## 第五節 ヒト胎児腎臓由来 293FT 細胞発現 CYP2B6 バリエントの定量

### 5-1. CYP2B6 バリエントタンパク質の含量測定

CYP2B6 は細胞内で、酵素活性のないアポ P450 と活性を有する酵素-補因子複合体ホロ P450、あるいはホロ P450 の変性体である P420 として存在すると考えられている[64, 65]。これらを含む 293FT 細胞発現 CYP2B6 タンパク質は、SDS-PAGE 後のウェスタンブロット法により定量を行った。スタンダードタンパク質として、市販の含量既知昆虫細胞発現系 CYP2B6 バキュロソーム (CYP2B6 Baculosomes; Thermo Fisher scientific) を利用して検量線を作製し、絶対定量にてバリエント間の発現量を比較した。昆虫細胞発現系 CYP2B6 0.06–0.4 pmol を試料として、それらの発光強度から検量線を作製し (Fig. 7)、発現タンパク質 5  $\mu$ g から検出されたバンド強度に対し絶対定量を行った。

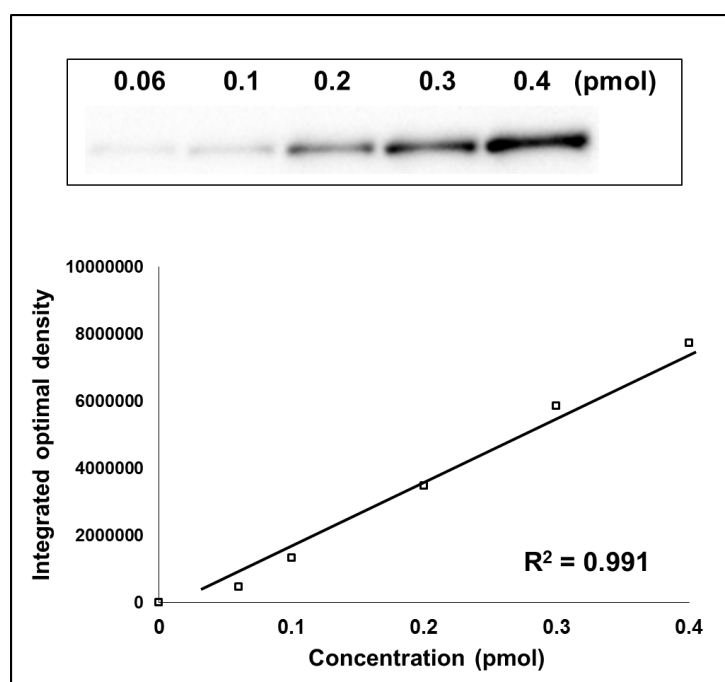


Fig. 7. Detection of CYP2B6 in Baculosomes by immunoblot analysis and standard curve of the immunoreactive proteins.

その結果、CYP2B6.1 の発現量が 40.2 pmol CYP2B6/mg microsomal protein であったのに対し、12 種類の CYP2B6 バリエント (CYP2B6.12、CYP2B6.15、CYP2B6.16、CYP2B6.18–21、CYP2B6.25、Arg378Ter、Arg158Gly、Ile382Asn 及び Arg443Cys) で発現量の有意な低下が認められた ( $P < 0.05$ )。その他のバリエントでは、野生型と同程度の発現量であった (Fig. 8)。

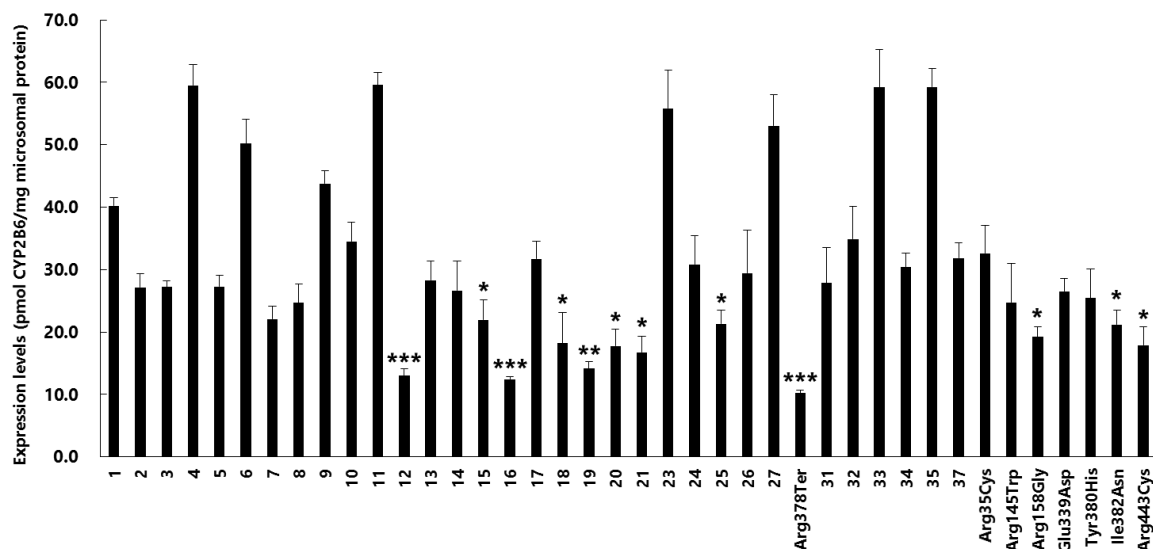
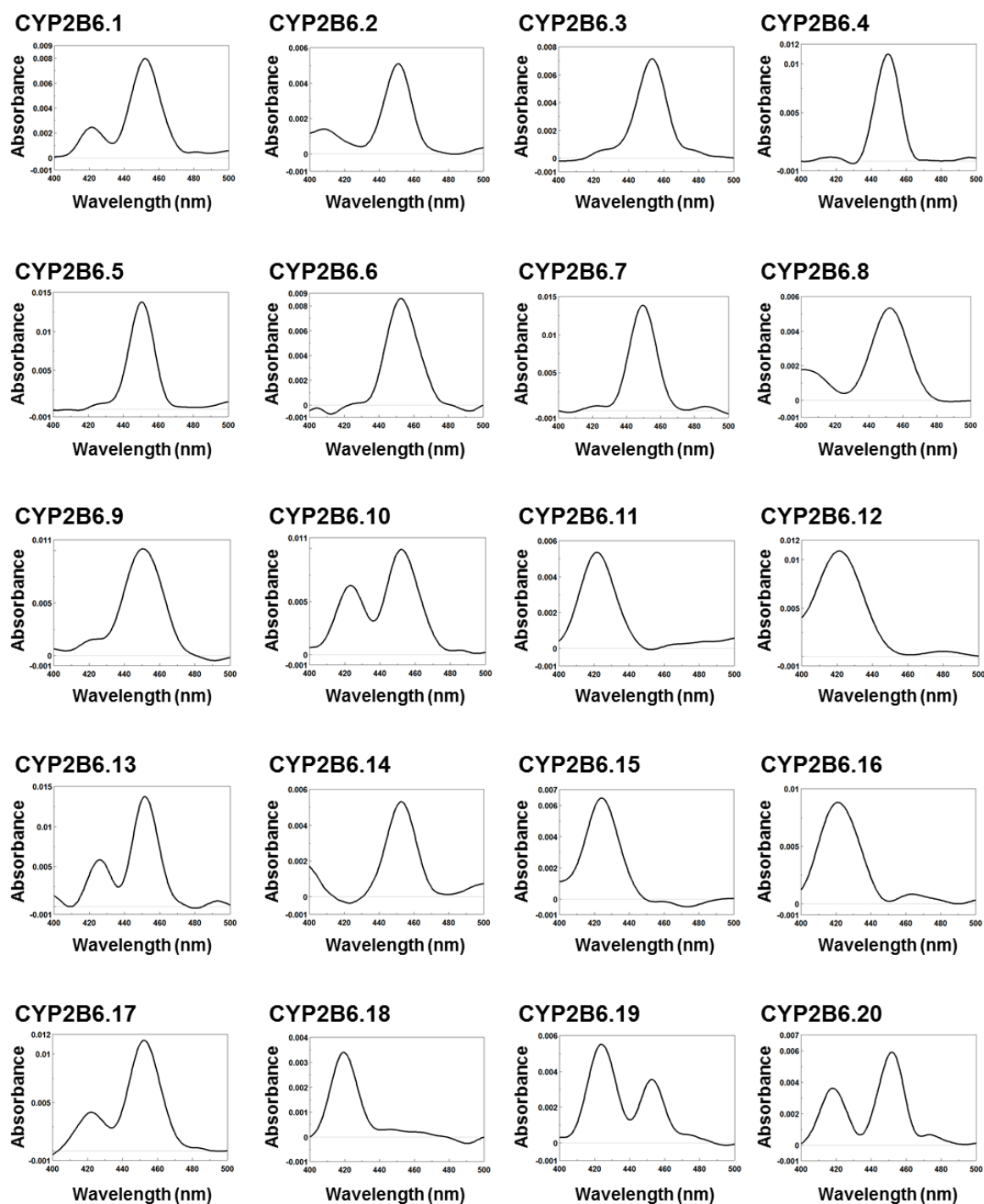


Fig. 8. Expression levels of CYP2B6 proteins expressed in 293FT cells. Each bar is presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independently performed western blotting. The numbers correspond to each CYP2B6 variants. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$  compared to CYP2B6.1

## 5-2. CYP2B6 バリエントのホロ P450 含量測定

P450 は補因子であるヘムと結合し、ホロ P450 となることで活性体となる[66-68]。293FT 細胞中に発現させた野生型及び CYP2B6 バリエント酵素のホロ P450 量を定量するため、還元状態における CO 差スペクトル測定を行った。各バリエントの CO 差スペクトル測定におけるピークを Fig. 9 に示した。野生型である CYP2B6.1 及び 28 種類の CYP2B6 バリエント (CYP2B6.2–10、CYP2B6.13、CYP2B6.14、CYP2B6.17、CYP2B6.19、CYP2B6.20、CYP2B6.23、CYP2B6.25–27、CYP2B6.31–35、Arg35Cys、Arg145Trp、Arg158Gly、Glu339Asp 及び Tyr380His) において 450 nm 付近に吸収極大が認められ、その吸光度よりホロ P450 含量を算出した。その他 11 種類の CYP2B6 バリエント (CYP2B6.11、CYP2B6.12、CYP2B6.15、CYP2B6.16、CYP2B6.18、CYP2B6.21、CYP2B6.24、CYP2B6.28、

CYP2B6.37、Ile382Asn 及び Arg443Cys) とコントロールミクロソーム画分においては、450 nm 付近に吸収極大が認められなかった。CYP2B6.1 の発現量が 31.5 pmol CYP2B6/mg microsomal protein であったのに対し、CYP2B6.19 のみ発現量の有意な低下が認められ、11.1 pmol CYP2B6/mg microsomal protein であった ( $P < 0.05$ )。発現量が算出できたその他 27 種類のバリエント CYP2B6 は、野生型と同程度の発現量であった (Fig. 10)。



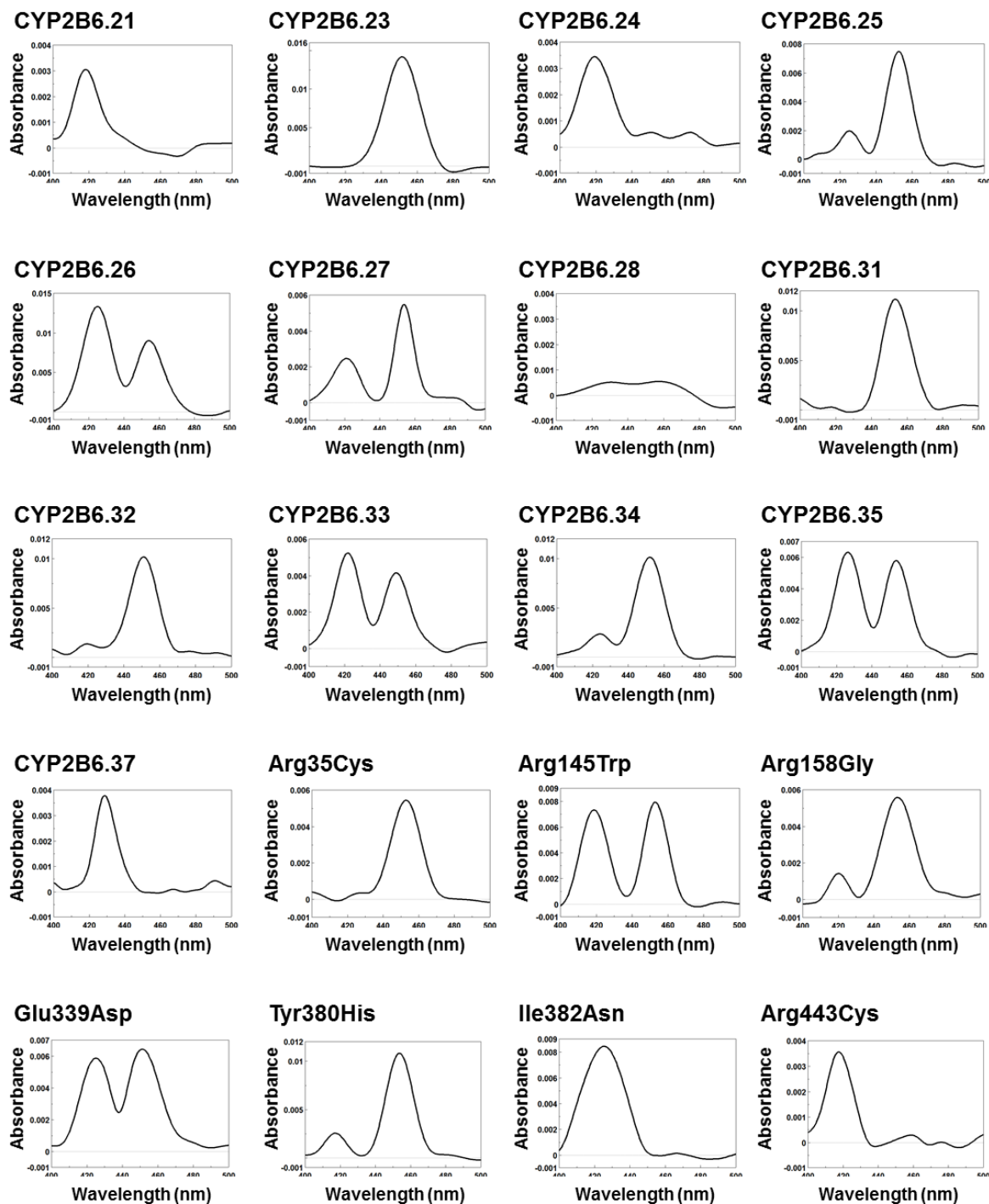


Fig. 9. Representative CO difference spectra of CYP2B6 variant proteins expressed in 293FT cells.

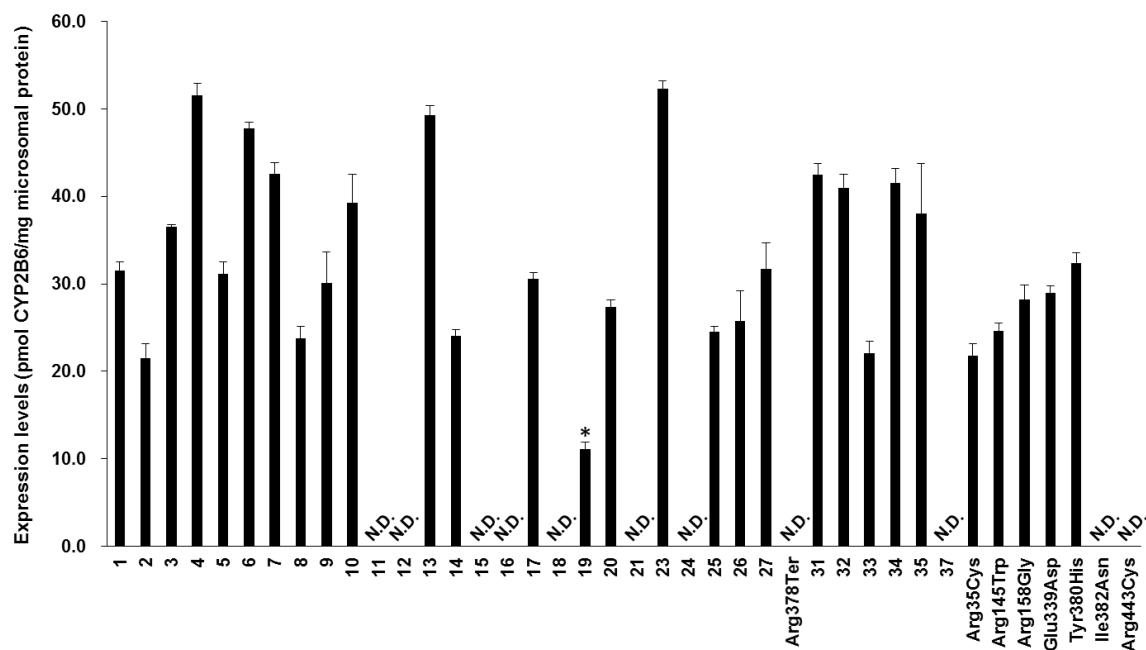


Fig. 10. Expression levels of CYP2B6 proteins expressed in 293FT cells. Each bar is presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independently performed CO-difference spectra readings. The numbers correspond to each CYP2B6 variants. \* $P < 0.05$  compared to CYP2B6.1



## 第六節 EFZ を用いた CYP2B6 バリエントの酵素反応速度論的解析

各 CYP2B6 バリエントの酵素機能変化を評価するため、CYP2B6 が主要な代謝を担う抗 HIV 薬 EFZ を基質薬物として[57-59]、酵素反応速度論的解析を行った。野生型である CYP2B6.1 及び各 CYP2B6 バリエント酵素を発現させた 293FT 細胞のミクロソーム画分 30  $\mu\text{g}$  に対して、0.5–20  $\mu\text{M}$  の濃度の異なる EFZ を加えて、37°C で 30 分間反応させた (Fig. 11)。主代謝物である 8-HEZ を LC-MS/MS により定量し (Fig. 12)、各 CYP2B6 バリエントの酵素反応速度論的パラメータを算出した。8-HEZ は、I.S.として 8-HEZ-d4 体を用いた内部標準法により解析した。なお、EFZ 8 位水酸化反応の  $V_{\text{max}}$  値及び固有クリアランス  $CL_{\text{int}}$  ( $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$ ) 値は、CO 差スペクトル測定法により定量したホロ P450 含量 (pmol CYP2B6) により補正した。

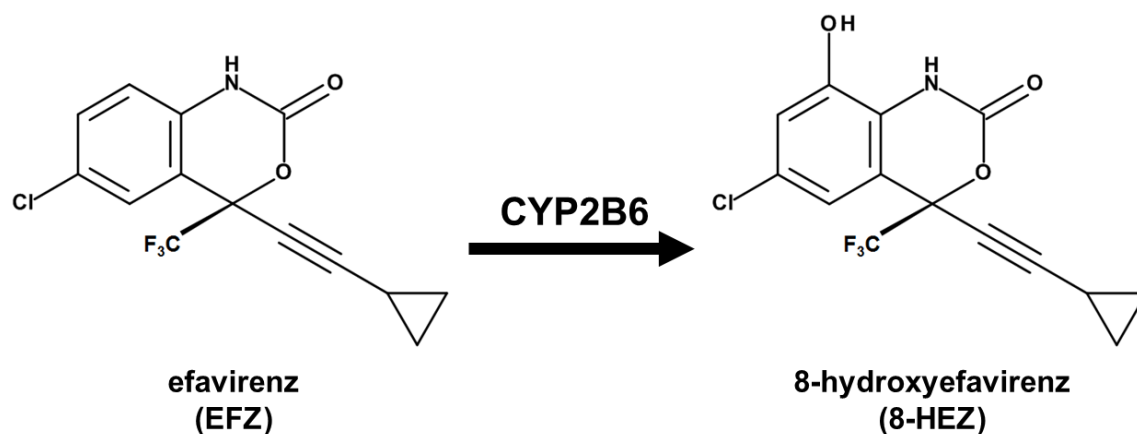


Fig. 11. Metabolic pathway for efavirenz catalyzed by CYP2B6.

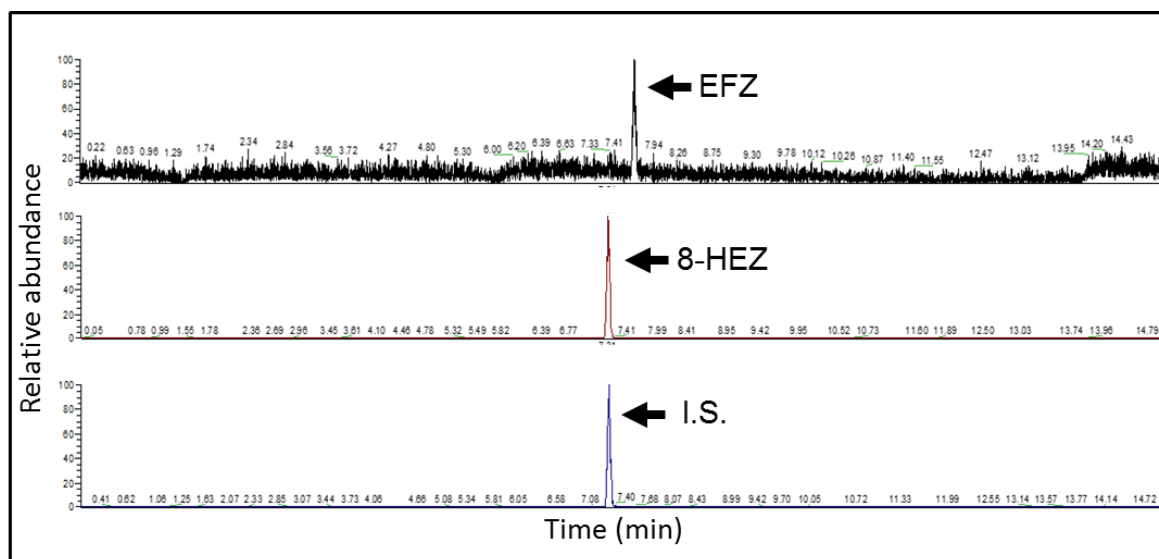


Fig. 12. Chromatogram of efavirenz (7.7 min), 8-hydroxyefavirenz (7.3 min), and 8-hydroxyefavirenz-d4 (7.3 min, I.S.).

CYP2B6.1 を含む 40 種類のバリエント酵素のうち 15 種類のバリエント (CYP2B6.8、CYP2B6.11–CYP2B6.13、CYP2B6.15、CYP2B6.16、CYP2B6.18、CYP2B6.21、CYP2B6.24、CYP2B6.28、CYP2B6.35、CYP2B6.37、Arg145Trp、Ile382Asn 及び Arg443Cys) は、用いた基質濃度最高点である 20  $\mu\text{M}$  においても代謝物は検出されず、酵素反応速度論的パラメータを算出することができなかった。一方、CYP2B6.1 及び 24 種類のバリエント酵素 (CYP2B6.2–CYP2B6.7、CYP2B6.9、CYP2B6.10、CYP2B6.14、CYP2B6.17、CYP2B6.19、CYP2B6.20、CYP2B6.23、CYP2B6.25–CYP2B6.27、CYP2B6.31–CYP2B6.34、Arg35Cys、Arg158Gly、Glu339Asp 及び Tyr380His) における代謝反応は、基質濃度最高点 20  $\mu\text{M}$  までの 8 点全てにおいて代謝物を定量することができ、Michaelis-Menten の式に従う曲線を描くことが確認された (Fig. 13)。各バリエントの酵素反応速度論的パラメータを Table 5 に示した。CYP2B6.1 の  $K_m$  値、 $V_{\max}$  値及び  $CL_{\text{int}}$  値はそれぞれ 4.09  $\mu\text{M}$ 、0.35  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{pmol}^{-1}$  CYP2B6 及び 0.086  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{pmol}^{-1}$  CYP2B6 であった。CYP2B6.1 と比較して、CYP2B6.14 及び CYP2B6.19 において  $K_m$  値の有意な上昇 ( $P < 0.05$ )、Tyr380His において  $V_{\max}$  値の

有意な低下 ( $P < 0.05$ ) が認められ、その結果これらのバリエント酵素において  $CL_{int}$  値の有意な低下が認められた (CYP2B6.14;  $P < 0.005$ 、CYP2B6.19;  $P < 0.05$ 、Tyr380His;  $P < 0.005$ )。一方 CYP2B6.6 においては、 $V_{max}$  値の有意な上昇 ( $P < 0.05$ ) に伴い  $CL_{int}$  値の有意な上昇が認められた ( $P < 0.005$ )。また、CYP2B6.1 と比較して、CYP2B6.7 ( $P < 0.05$ )、CYP2B6.26 ( $P < 0.05$ )、CYP2B6.32 ( $P < 0.005$ )、CYP2B6.33 ( $P < 0.005$ ) 及び CYP2B6.34 ( $P < 0.05$ ) において  $CL_{int}$  値の有意な上昇が認められたのに対し、CYP2B6.10 ( $P < 0.05$ )、Arg158Gly ( $P < 0.005$ ) 及び Glu339Asp ( $P < 0.01$ ) においては、 $CL_{int}$  値の有意な低下が認められた。その他 12 種類のバリエント酵素については、CYP2B6.1 と比較して酵素反応速度論的パラメータの有意な変動は認められなかった。

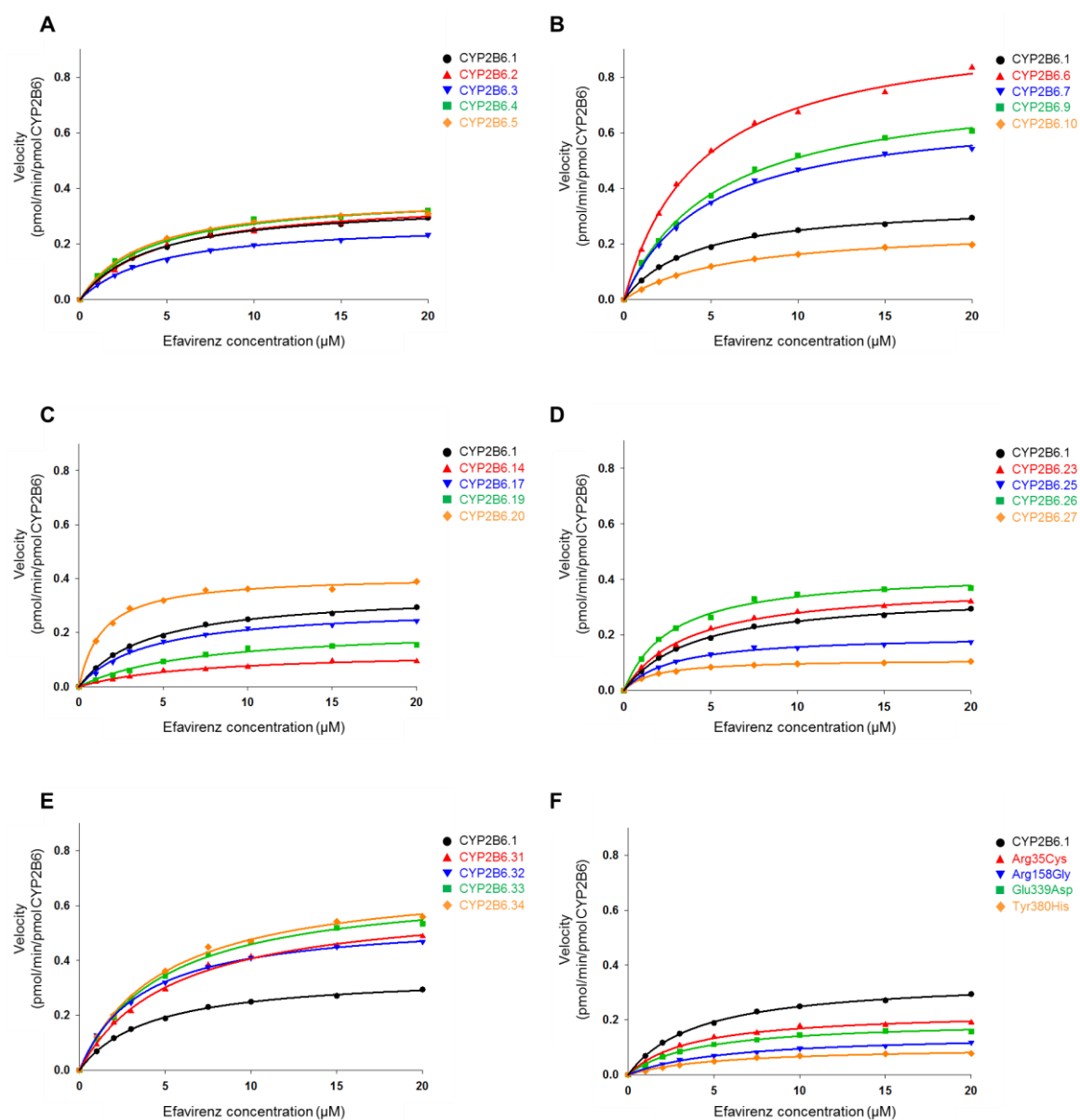


Fig. 13. Michaelis-Menten curves of CYP2B6 wild-type and CYP2B6 variants expressed in 293FT cells. A, CYP2B6.1, CYP2B6.2, CYP2B6.3, CYP2B6.4, and CYP2B6.5; B, CYP2B6.1, CYP2B6.6, CYP2B6.7, CYP2B6.9, and CYP2B6.10; C, CYP2B6.1, CYP2B6.14, CYP2B6.17, CYP2B6.19, and CYP2B6.20; D, CYP2B6.1, CYP2B6.23, CYP2B6.25, CYP2B6.26, and CYP2B6.27; E, CYP2B6.1, CYP2B6.31, CYP2B6.32, CYP2B6.33, and CYP2B6.34; F, CYP2B6.1, Arg35Cys, Arg158Gly, Glu339Asp, and Tyr380His.

**Table 5.** Kinetic parameters of EFZ 8-hydroxylation

Variants	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ (pmol/min/pmol CYP2B6)	$CL_{\text{int}}$ ( $V_{\max}/K_m$ ) ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol}$ CYP2B6)	% of wild-type $CL_{\text{int}}$
CYP2B6.1	$4.09 \pm 0.15$	$0.35 \pm 0.03$	$0.086 \pm 0.004$	
CYP2B6.2	$4.53 \pm 0.42$	$0.37 \pm 0.02$	$0.081 \pm 0.003$	95%
CYP2B6.3	$4.57 \pm 1.22$	$0.28 \pm 0.02$	$0.064 \pm 0.013$	75%
CYP2B6.4	$3.70 \pm 0.66$	$0.38 \pm 0.00$	$0.105 \pm 0.020$	122%
CYP2B6.5	$4.13 \pm 0.44$	$0.38 \pm 0.06$	$0.094 \pm 0.018$	109%
CYP2B6.6	$4.34 \pm 0.20$	$0.99 \pm 0.06^*$	$0.228 \pm 0.006^{***}$	266%
CYP2B6.7	$4.82 \pm 0.22$	$0.69 \pm 0.05$	$0.143 \pm 0.007^*$	166%
CYP2B6.8	N.D.	N.D.	N.D.	
CYP2B6.9	$5.31 \pm 0.27$	$0.78 \pm 0.04$	$0.148 \pm 0.016$	172%
CYP2B6.10	$6.04 \pm 1.13$	$0.26 \pm 0.03$	$0.044 \pm 0.005^*$	51%
CYP2B6.11	N.D.	N.D.	N.D.	
CYP2B6.12	N.D.	N.D.	N.D.	
CYP2B6.13	N.D.	N.D.	N.D.	
CYP2B6.14	$7.27 \pm 1.95^*$	$0.13 \pm 0.01$	$0.019 \pm 0.004^{***}$	22%
CYP2B6.15	N.D.	N.D.	N.D.	
CYP2B6.16	N.D.	N.D.	N.D.	
CYP2B6.17	$4.11 \pm 0.42$	$0.30 \pm 0.00$	$0.073 \pm 0.007$	85%
CYP2B6.18	N.D.	N.D.	N.D.	
CYP2B6.19	$7.09 \pm 1.13^*$	$0.22 \pm 0.01$	$0.032 \pm 0.006^*$	37%
CYP2B6.20	$1.51 \pm 0.58$	$0.41 \pm 0.03$	$0.311 \pm 0.139$	363%
CYP2B6.21	N.D.	N.D.	N.D.	

CYP2B6.23	3.74 ± 0.24	0.38 ± 0.02	0.103 ± 0.007	120%
CYP2B6.24	N.D.	N.D.	N.D.	
CYP2B6.25	2.85 ± 0.66	0.20 ± 0.01	0.072 ± 0.013	85%
CYP2B6.26	2.74 ± 0.16	0.43 ± 0.01	0.157 ± 0.011*	183%
CYP2B6.27	1.73 ± 0.46	0.11 ± 0.01	0.067 ± 0.015	79%
Arg378Ter	N.D.	N.D.	N.D.	
CYP2B6.31	5.35 ± 0.87	0.63 ± 0.07	0.118 ± 0.006	137%
CYP2B6.32	3.63 ± 0.20	0.56 ± 0.01	0.153 ± 0.005***	179%
CYP2B6.33	4.81 ± 0.46	0.68 ± 0.05	0.142 ± 0.004***	165%
CYP2B6.34	4.85 ± 0.59	0.71 ± 0.04	0.147 ± 0.009*	171%
CYP2B6.35	N.D.	N.D.	N.D.	
CYP2B6.37	N.D.	N.D.	N.D.	
Arg35Cys	3.77 ± 0.54	0.23 ± 0.02	0.062 ± 0.011	73%
Arg145Trp	N.D.	N.D.	N.D.	
Arg158Gly	5.95 ± 1.75	0.15 ± 0.02	0.026 ± 0.005***	30%
Glu339Asp	4.05 ± 0.17	0.20 ± 0.00	0.049 ± 0.002**	57%
Tyr380His	5.52 ± 0.89	0.10 ± 0.01*	0.019 ± 0.002***	22%
Ile382Asn	N.D.	N.D.	N.D.	
Arg443Cys	N.D.	N.D.	N.D.	

---

These data represent the mean ± SD of three independently performed catalytic assays.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.005$  compared with CYP2B6.1. N.D. represents not determined.

The kinetic parameters of EFZ 8-hydroxylation regarding 15 variants could not be determined because the enzymatic activity of CYP2B6 was not detected at the highest substrate concentration assayed (20  $\mu$ M EFZ).

## 第七節 CYP2B6 バリエントの酵素機能変化に対する基質特異性評価

各 CYP2B6 バリエントで、異なる基質薬物において代謝活性の変化に基質特異性が存在するか否かを評価するため、第六節で得られた EFZ 代謝活性に加え、*in vitro* 試験における CYP2B6 の酵素活性プローブ薬である 7-ETC を用いた酵素反応速度論的解析を行った[59-61]。7-ETC *O*-脱エチル化反応は、野生型及び各 CYP2B6 バリエント酵素を発現させた 293FT 細胞のミクロソーム画分 30  $\mu\text{g}$  に対し、1–50  $\mu\text{M}$  の濃度の異なる 7-ETC を加えて、37°C で 20 分間反応させた (Fig. 14)。代謝物である 7-HTC を HPLC 及び蛍光検出法により定量し (Fig. 15)、各 CYP2B6 バリエントの酵素反応速度論的パラメータを算出した。7-HTC は、絶対検量線法により解析した。なお、7-ETC *O*-脱エチル化反応の  $V_{\text{max}}$  値及び  $CL_{\text{int}}$  値は、CO 差スペクトル測定法により定量したホロ CYP 含量 (pmol CYP2B6) により補正した。

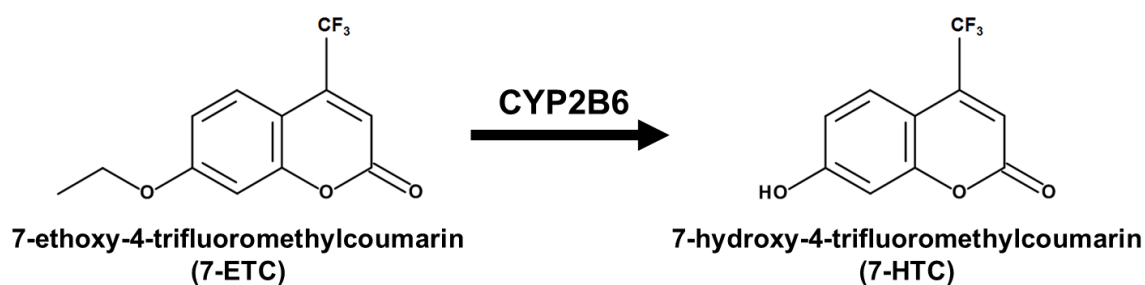


Fig. 14. Primary metabolic pathway of 7-ETC.

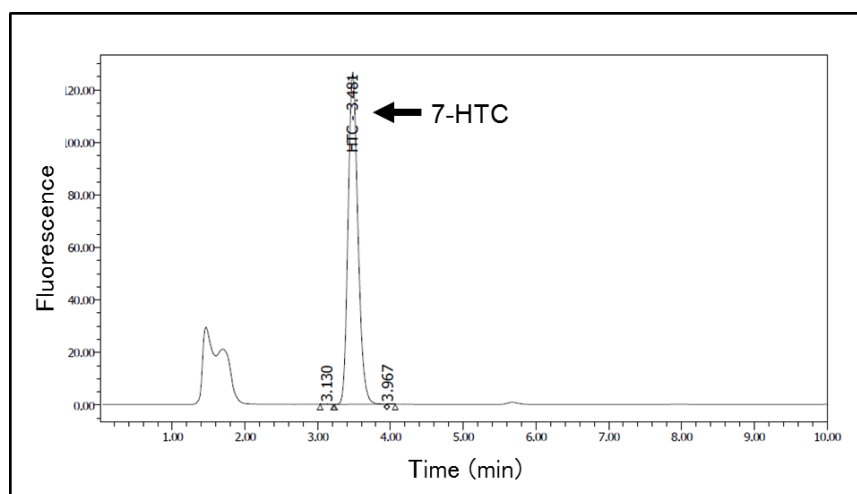


Fig. 15. Chromatogram of 7-HTC (3.4 min).

EFZを用いた解析において酵素反応速度論的パラメータが算出できなかった15種類のバリエーション (CYP2B6.8、CYP2B6.11–CYP2B6.13、CYP2B6.15、CYP2B6.16、CYP2B6.18、CYP2B6.21、CYP2B6.24、CYP2B6.28、CYP2B6.35、CYP2B6.37、Arg145Trp、Ile382Asn 及び Arg443Cys) は、7-ETC 濃度最高点である 50  $\mu$ M においても代謝物は検出されず、酵素反応速度論的パラメータを算出することができなかった。CYP2B6.1 及び 24 種類のバリエーション酵素 (CYP2B6.2–CYP2B6.7、CYP2B6.9、CYP2B6.10、CYP2B6.14、CYP2B6.17、CYP2B6.19、CYP2B6.20、CYP2B6.23、CYP2B6.25–CYP2B6.27、CYP2B6.31–CYP2B6.34、Arg35Cys、Arg158Gly、Glu339Asp 及び Tyr380His) における代謝反応は、EFZ 同様 Michaelis-Menten の式に従う曲線を描くことが確認され (Fig. 16)、酵素反応速度論的パラメータを算出した (Table 6)。7-ETC *O*-脱エチル化反応から得られた各 CYP2B6 バリエーションの野生型に対する  $CL_{int}$  比は、EFZ 8 位水酸化反応におけるそれぞれの  $CL_{int}$  比と高い相関を示す結果となった ( $R^2 = 0.837$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 17)。



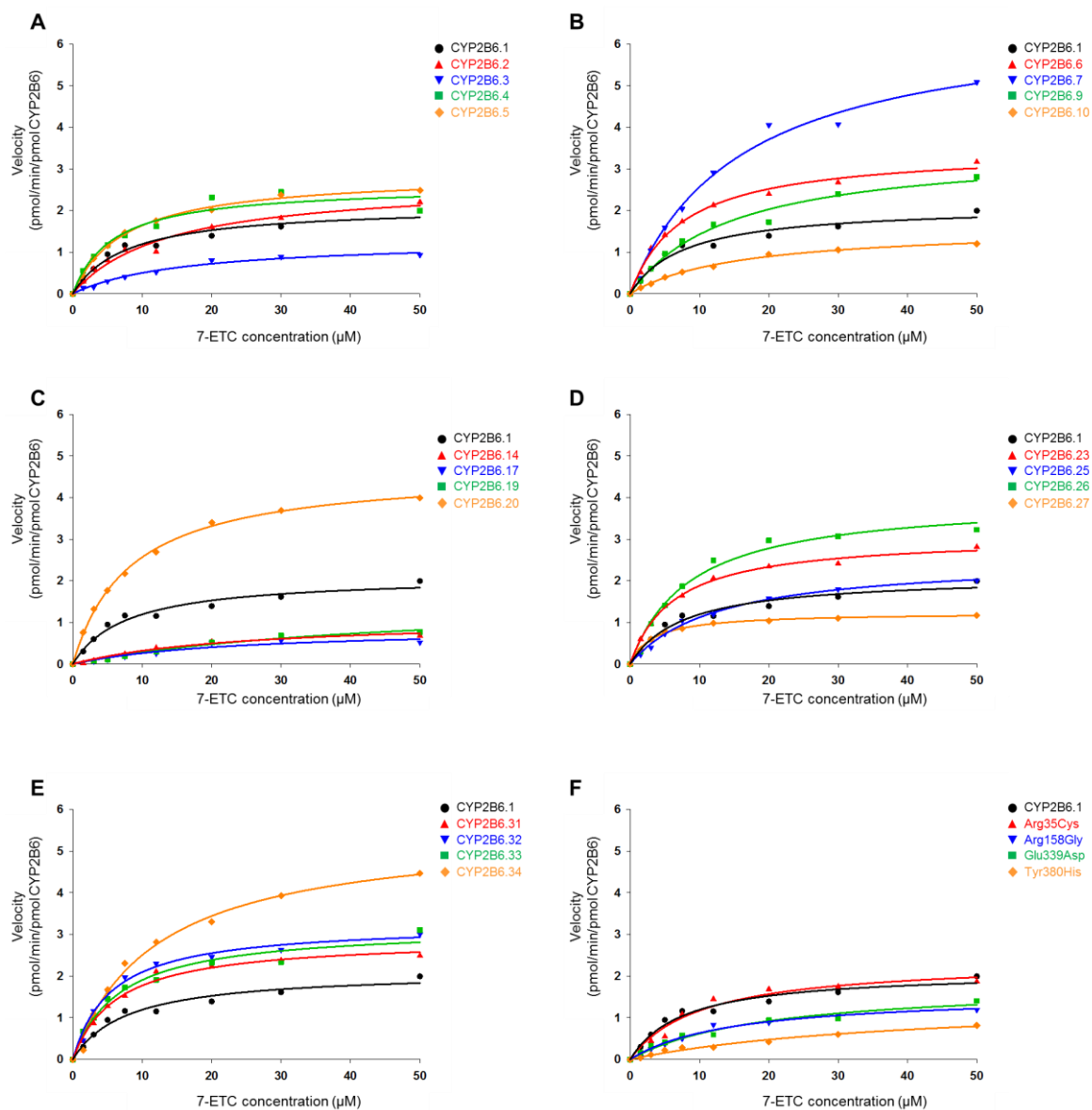


Fig. 16. Michaelis-Menten curves of CYP2B6 wild-type and CYP2B6 variants expressed in 293FT cells. A, CYP2B6.1, CYP2B6.2, CYP2B6.3, CYP2B6.4, and CYP2B6.5; B, CYP2B6.1, CYP2B6.6, CYP2B6.7, CYP2B6.9, and CYP2B6.10; C, CYP2B6.1, CYP2B6.14, CYP2B6.17, CYP2B6.19, and CYP2B6.20; D, CYP2B6.1, CYP2B6.23, CYP2B6.25, CYP2B6.26, and CYP2B6.27; E, CYP2B6.1, CYP2B6.31, CYP2B6.32, CYP2B6.33, and CYP2B6.34; F, CYP2B6.1, Arg35Cys, Arg158Gly, Glu339Asp, and Tyr380His.

**Table 6.** Kinetic parameters of 7-ETC *O*-deethylation

Variants	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ (pmol/min/pmol CYP2B6)	$CL_{\text{int}}$ ( $V_{\max}/K_m$ ) ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol}$ CYP2B6)	% of wild-type $CL_{\text{int}}$
CYP2B6.1	$7.58 \pm 1.50$	$2.11 \pm 0.44$	$0.279 \pm 0.005$	
CYP2B6.2	$14.90 \pm 3.84$	$2.85 \pm 0.82$	$0.190 \pm 0.010$	68%
CYP2B6.3	$19.07 \pm 7.54$	$1.36 \pm 0.07$	$0.082 \pm 0.042$	30%
CYP2B6.4	$5.80 \pm 0.84$	$2.61 \pm 0.33$	$0.451 \pm 0.031$	162%
CYP2B6.5	$7.65 \pm 1.20$	$2.88 \pm 0.19$	$0.380 \pm 0.038$	137%
CYP2B6.6	$7.85 \pm 0.71$	$3.53 \pm 0.24$	$0.453 \pm 0.054$	163%
CYP2B6.7	$16.22 \pm 3.39$	$6.73 \pm 1.10^*$	$0.419 \pm 0.040$	150%
CYP2B6.9	$14.24 \pm 3.03$	$3.56 \pm 0.33$	$0.255 \pm 0.040$	92%
CYP2B6.10	$15.78 \pm 0.17$	$1.60 \pm 0.38$	$0.101 \pm 0.025$	36%
CYP2B6.14	$24.34 \pm 3.64$	$1.09 \pm 0.12$	$0.045 \pm 0.004$	16%
CYP2B6.17	$24.92 \pm 4.36$	$0.85 \pm 0.06$	$0.035 \pm 0.003$	12%
CYP2B6.19	$45.34 \pm 10.94$	$1.59 \pm 0.60$	$0.034 \pm 0.006$	12%
CYP2B6.20	$8.55 \pm 2.12$	$4.70 \pm 0.24^*$	$0.571 \pm 0.132$	205%
CYP2B6.23	$6.79 \pm 1.44$	$3.17 \pm 0.26$	$0.476 \pm 0.067$	171%
CYP2B6.25	$13.83 \pm 2.06$	$2.62 \pm 0.07$	$0.192 \pm 0.023$	69%
CYP2B6.26	$9.10 \pm 2.46$	$4.11 \pm 0.57$	$0.464 \pm 0.070$	167%
CYP2B6.27	$3.30 \pm 0.42$	$1.24 \pm 0.03$	$0.378 \pm 0.044$	136%
CYP2B6.31	$6.62 \pm 1.34$	$2.94 \pm 0.20$	$0.454 \pm 0.077$	163%
CYP2B6.32	$5.57 \pm 0.10$	$3.27 \pm 0.13$	$0.587 \pm 0.033$	211%
CYP2B6.33	$7.96 \pm 3.24$	$3.33 \pm 0.58$	$0.472 \pm 0.204$	169%
CYP2B6.34	$12.14 \pm 1.61$	$5.53 \pm 0.21^*$	$0.460 \pm 0.043$	165%

Arg35Cys	10.28 ± 1.03	2.37 ± 0.13	0.232 ± 0.012	83%
Arg158Gly	15.18 ± 2.51	1.59 ± 0.04	0.106 ± 0.016	38%
Glu339Asp	26.34 ± 6.16	2.12 ± 0.11	0.084 ± 0.022	30%
Tyr380His	28.67 ± 1.29***	1.14 ± 0.09	0.040 ± 0.004	14%

---

These data represent the mean ± SD of three independently performed catalytic assays.

\* $P < 0.05$ , and \*\*\* $P < 0.005$  compared with CYP2B6.1.

The kinetic parameters of 7-ETC *O*-deethylation regarding 15 variants

(CYP2B6.8, .11–.13, .15, .16, .18, .21, .24, Arg378Ter, .35, .37, Arg145Trp, Ile382Asn, and Arg443Cys)

could not be determined because the enzymatic activity of CYP2B6 was not detected at the highest

substrate concentration assayed (50 μM 7-ETC).

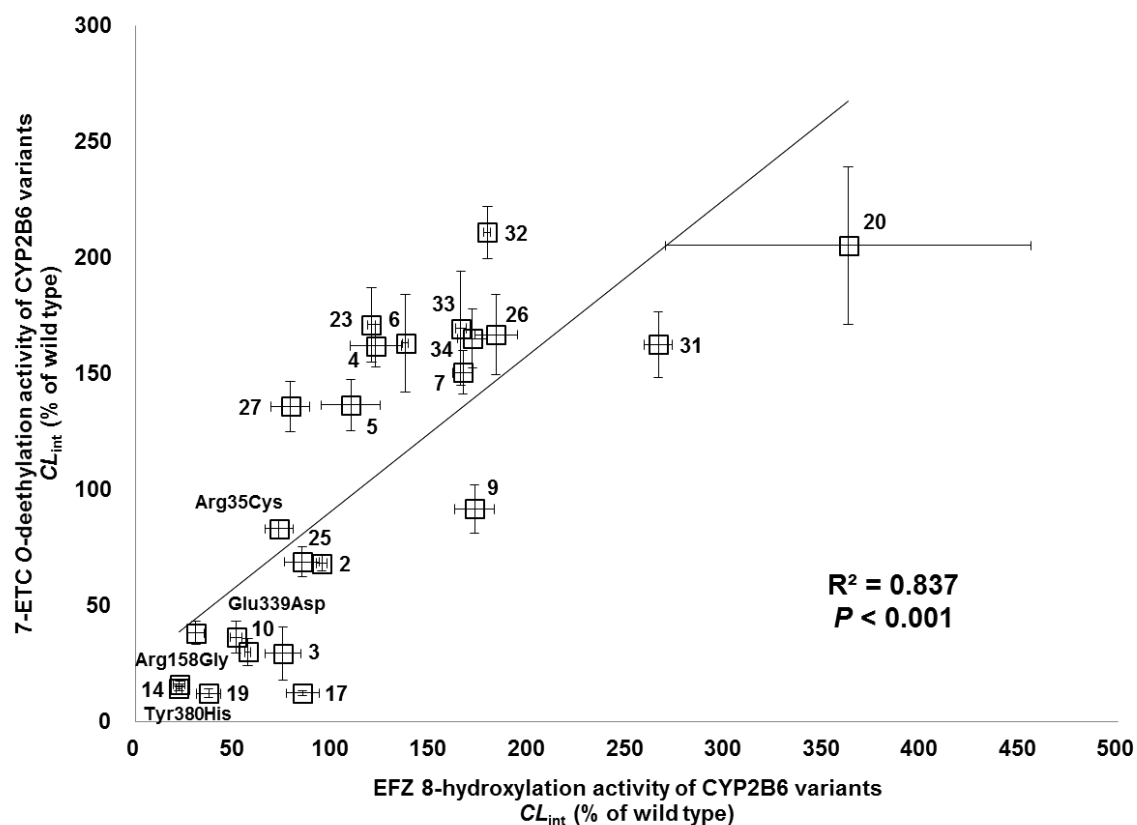


Fig. 17. Correlation between the  $CL_{int}$  ratios (relative to CYP2B6.1) for EFZ 8-hydroxylation and 7-ETC *O*-deethylation among CYP2B6 variants. EFZ 8-hydroxylation  $CL_{int}$  ratios are plotted on the horizontal axis and 7-ETC *O*-deethylation  $CL_{int}$  ratios are plotted on the vertical axis. Numbers correspond to CYP2B6 variants. Each bar is presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independently performed catalytic assays. The correlation was analyzed using a weighted linear regression analysis using IBM SPSS Statistics.

## 第八節 CYP2B6 バリエーションの 3D ドッキングシミュレーションモデル解析

各 CYP2B6 バリエーション酵素は特定のアミノ酸置換を有しており、酵素機能の変化は各バリエーション酵素のアミノ酸置換に伴う二次元及び三次元構造の変化に起因していると考えられる。P450 分子種には共通する複数の  $\alpha$  ヘリックス構造や  $\beta$  シート構造を有しており、基質結合部位の構成やヘムの結合に重要な役割を担っている[69, 70]。また、小胞体膜に存在するために必要な配列である膜アンカー領域 (membrane anchor region) やプロリンに富む領域 (proline-rich region: *PR*)、K ヘリックス領域 (K-region: *K*)、芳香族領域 (aromatic region: *Ar*) 及びヘム結合領域 (heme-binding region) などが存在する (Fig. 18)[71, 72]。 *PR*、*K* 及びヘム結合領域のアミノ酸配列は、ほとんどの P450 分子種で高度に保存されており、P450 が酵素活性を発現する上で重要な役割を果たすと考えられている。また、6 箇所の基質認識部位 (substrate recognition site: SRS)-1-6 が存在し、これらの領域においてアミノ酸置換が生じた場合、基質に対する親和性などに影響を及ぼす可能性が高い。

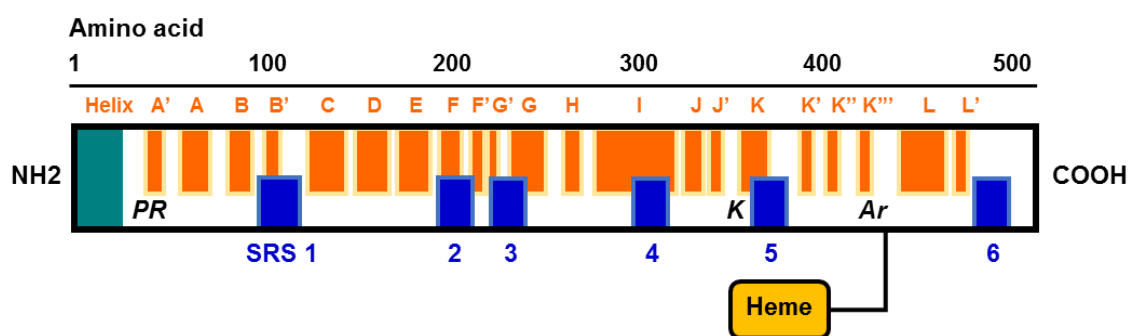


Fig. 18. Secondary structure of cytochrome P450.  $\alpha$ -Helices are indicated by orange boxes. Substrate recognition sites (SRS) are indicated by blue boxes. Membrane anchor region is indicated by green box. The line above the secondary structure of cytochrome P450 indicated amino acid number. *PR*; proline-rich region, *K*; K-region, *Ar*; Aromatic region.

現在までに微生物由来のP450やウサギ肝由来のCYP2C5が結晶化され立体構造が明らかとなり、これらを鋳型にして他の P450 分子種の立体構造を予測し、モデル化する試みがなされている[73-77]。CYP2B6においても複数の *in silico* 解析が行われ、基質薬物選択性や遺伝子多型による酵素機能変化のメカニズム解明が検証されている[78-81]。第八節では、CYP2B6 バリエント酵素 35 種類に該当する 33 種類のアミノ酸置換に対し、3D ドッキングシミュレーションモデル解析を行った。なお、CYP2B6.2 (Arg22Cys)、CYP2B6.10 (Gln21Leu 及び Arg22Cys) 及び CYP2B6.17 (Thr26Ser、Asp28Gly 及び Arg29Thr) は、膜アンカー領域にアミノ酸置換を有していることからモデル解析が不可能であり、また、CYP2B6\*28 に由来する Arg378Ter は終止コドンへの塩基置換によりタンパク質翻訳が途中で停止するため、今回の解析からは除外している。Protein Data Bank の 3IBD を参考にアミノ酸置換を挿入することで野生型である CYP2B6.1 を作製し、EFZ をドッキングさせた (Fig. 19)。CYP2B6 バリエントに関しては、それぞれのアミノ酸置換を導入し構造最適化を行った。

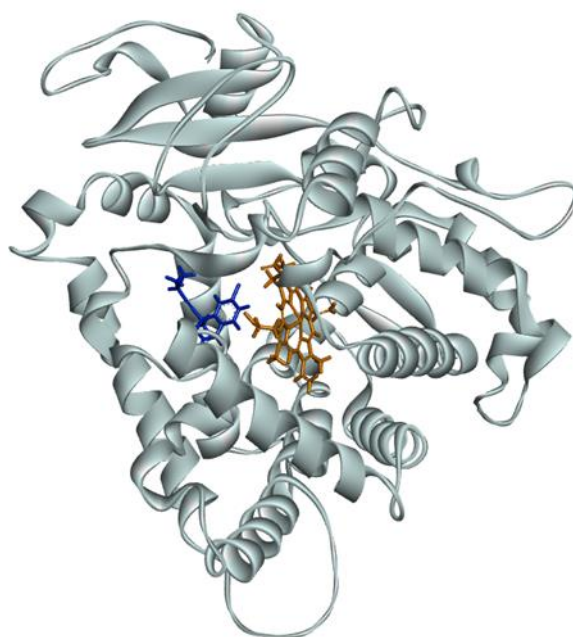


Fig. 19. A diagram of the overall structure of CYP2B6 coordinated with substrate (EFZ). Heme and EFZ are shown in orange and blue, respectively.

### Ser259Arg (CYP2B6.3)

Ser259Arg は G/H ループ上に位置しており、いずれのアミノ酸も Arg253 及び Asp257 と水素結合を形成している。このアミノ酸置換による他のアミノ酸残基との相互作用変化は認めなかった (Fig. 20)。

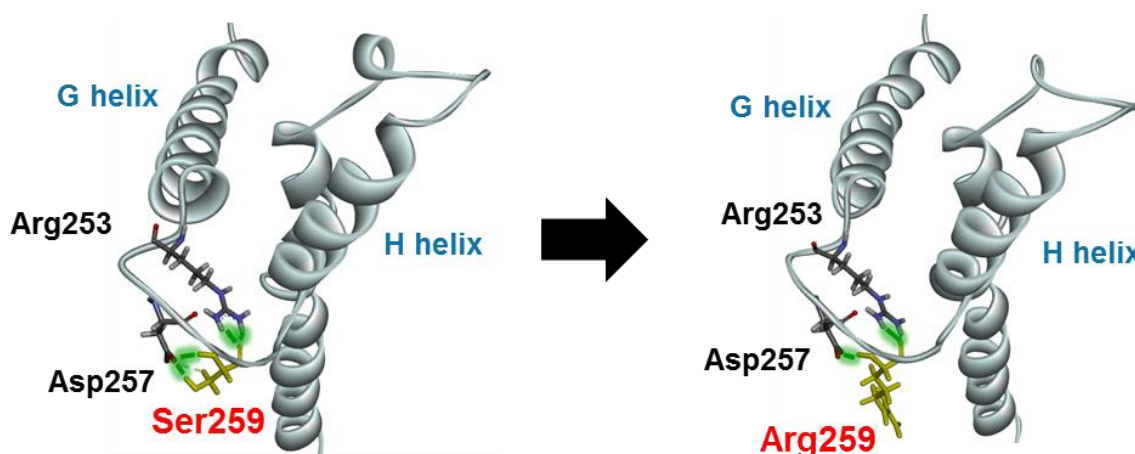


Fig. 20. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Ser259Arg (right panel) coordinated with EFZ. Ser259 and Arg259 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds are shown in green lines.

### Lys262Arg (CYP2B6.4, CYP2B6.6, CYP2B6.7, CYP2B6.13, CYP2B6.16, CYP2B6.19, CYP2B6.20, CYP2B6.26, CYP2B6.34, CYP2B6.37)

Lys262Arg は G/H ループ上に位置し、いずれのアミノ酸も D ヘリックス上の Arg145 と水素結合を形成している。アミノ酸置換により D ヘリックス上の Glu148 と電荷相互作用を、G/H ループ上の Asp263 と水素結合をそれぞれ形成していた。これにより、C/D ループ及び G/H ループ構造とそれらヘリックス構造の著しい立体構造変化が確認された (Fig. 21)。

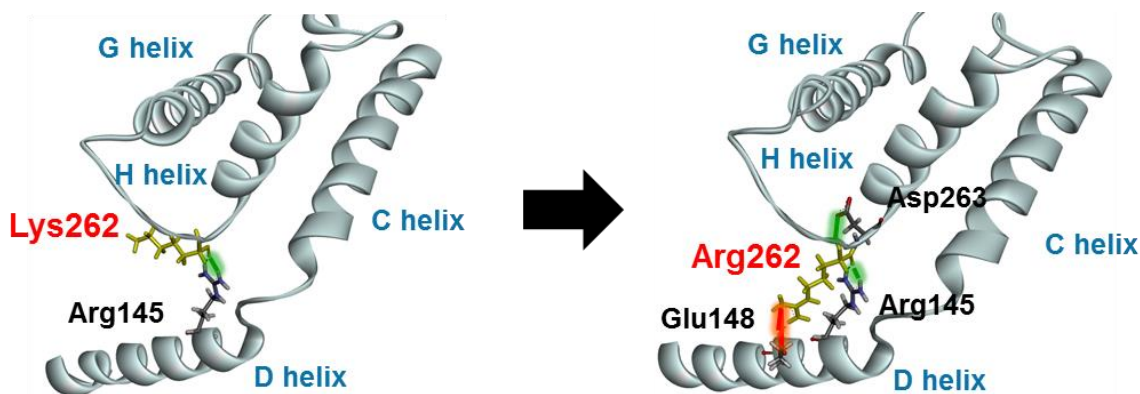


Fig. 21. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Lys262Arg (right panel) coordinated with EFZ. Lys262 and Arg262 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and attractive charge interaction are shown in green and red lines, respectively.

#### Arg487Cys (CYP2B6.5、CYP2B6.7)

Arg487Cysは、 $\beta$ 3 ストランド上に位置している。いずれのアミノ酸もDヘリックス近傍のLeu164と疎水性相互作用を、同じく  $\beta$ 3 ストランド上のMet459及びAla460と水素結合を形成しているが、アミノ酸置換によりSer461との水素結合解離を認めた。これにより、 $\beta$ 3 シートの立体構造変化が確認された (Fig. 22)。

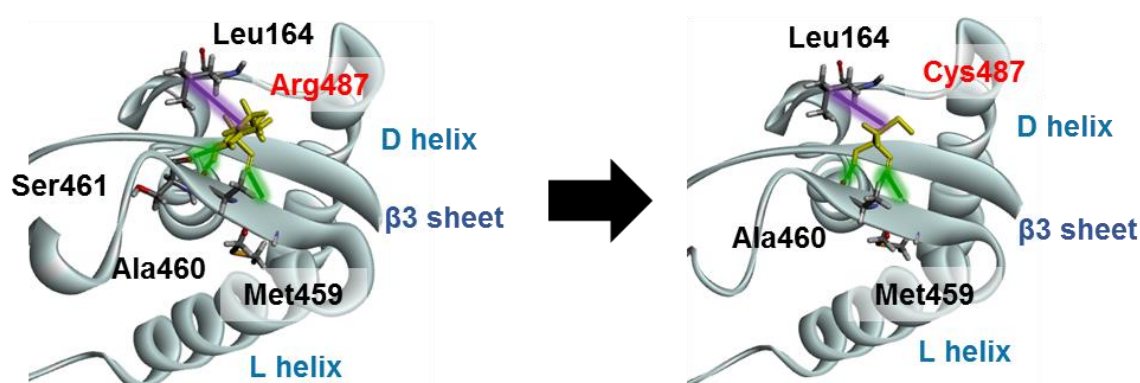


Fig. 22. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Arg487Cys (right panel) coordinated with EFZ. Arg487 and Cys487 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and alkyl interactions are shown in green and purple lines, respectively.



**Gln172His (CYP2B6.6, CYP2B6.7, CYP2B6.9, CYP2B6.13, CYP2B6.19, CYP2B6.20, CYP2B6.26, CYP2B6.34, CYP2B6.37)**

Gln172His は E ヘリックス上に位置している。アミノ酸置換により、I ヘリックス上の Thr302 を取り巻く複数のアミノ酸と新たな相互作用を認めた。これにより、I ヘリックスをはじめとするヘム近傍の構造とより強固な結合を形成していることが観察され、Thr302 周辺の立体構造の保持・安定化が確認された (Fig. 23)。

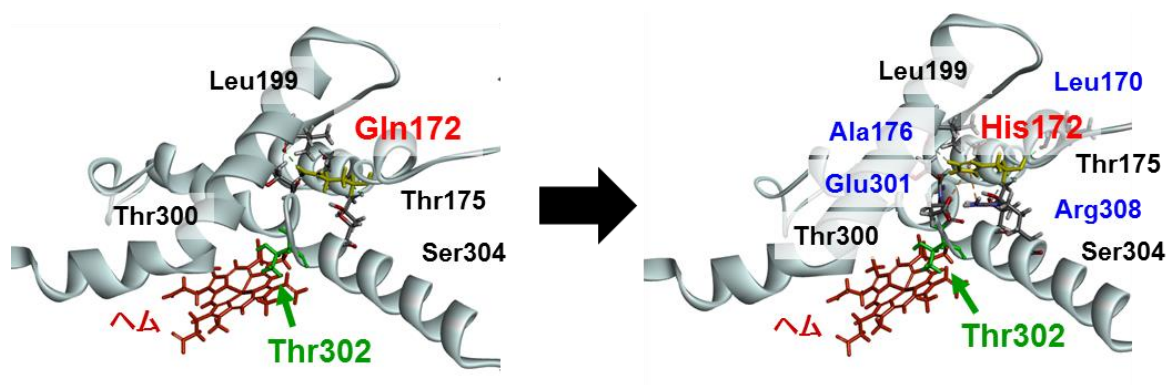


Fig. 23. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Gln172His (right panel) coordinated with EFZ. Gln172 and His172 residues are shown in yellow. Thr302 residue is shown in green.

**Lys139Gln (CYP2B6.8, CYP2B6.13)**

Lys139Gln は C/D ループ上に位置し、いずれのアミノ酸も Asp134 及び Met137 と  $\pi$  結合や電荷相互作用、水素結合を形成している。アミノ酸置換により Arg145 との新たな電荷相互作用を認めた一方で、Pro261 との疎水性相互作用ならびに Thr267 との水素結合解離が確認された。Pro261 は G/H ループ上、Thr267 は H ヘリックス上にそれぞれ位置しており、これらの相互作用消失によって C/D 及び G/H ループ間の著しい立体構造変化が確認された (Fig. 24)。

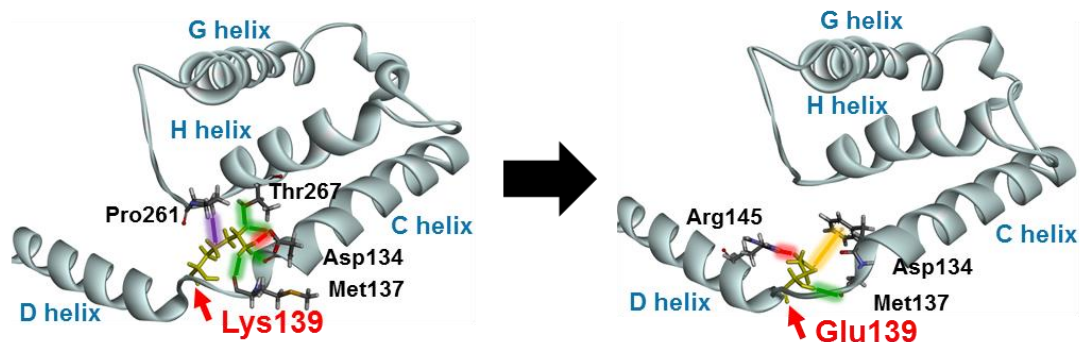


Fig. 24. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Lys139Glu (right panel) coordinated with EFZ. Lys139 and Gln139 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds, attractive charge interactions, alkyl interactions, and pi-anion interaction are shown in green, red, purple, and mustard lines, respectively.

#### Met46Val (CYP2B6.11)

Met46Val はプロリンリッチ領域近傍に位置している。いずれのアミノ酸も Leu43 と水素結合を形成しており、アミノ酸置換により Ser54 との水素結合ならびに Phe58 との  $\pi$  結合解離を認めた。これら 2 つのアミノ酸は共に A ヘリックス上に位置しており、相互作用消失によりプロリンリッチ領域及び A ヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 25)。

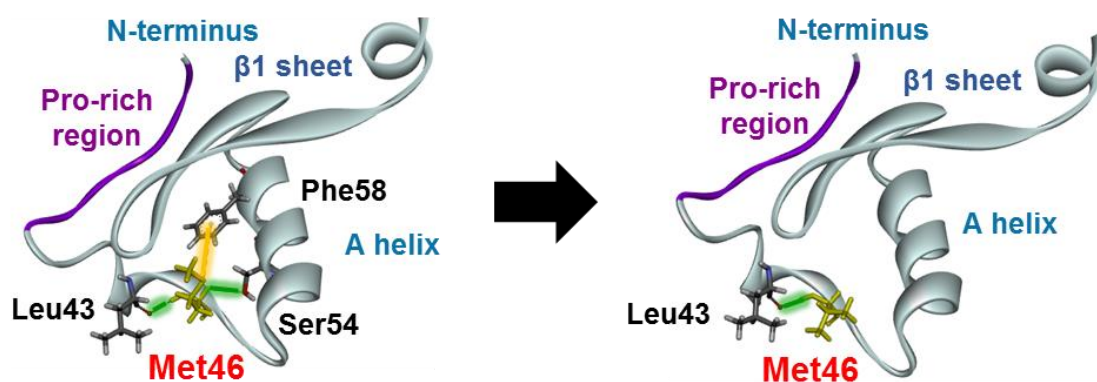


Fig. 25. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Met46Val (right panel) coordinated with EFZ. Met46 and Val46 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and pi-anion interaction are shown in green and mustard lines, respectively.

### Gly99Glu (CYP2B6.12)

Gly99Glu はヘム近傍の SRS-1 上に位置し、いずれのアミノ酸も Pro368 と水素結合を形成している。アミノ酸置換により Lys100 との電荷相互作用ならびに Ile101 との水素結合を新たに認めた。これら 2 つのアミノ酸はいずれも SRS-1 に位置していることから、ヘム近傍における SRS-1 の著しい立体構造変化が確認された (Fig. 26)。

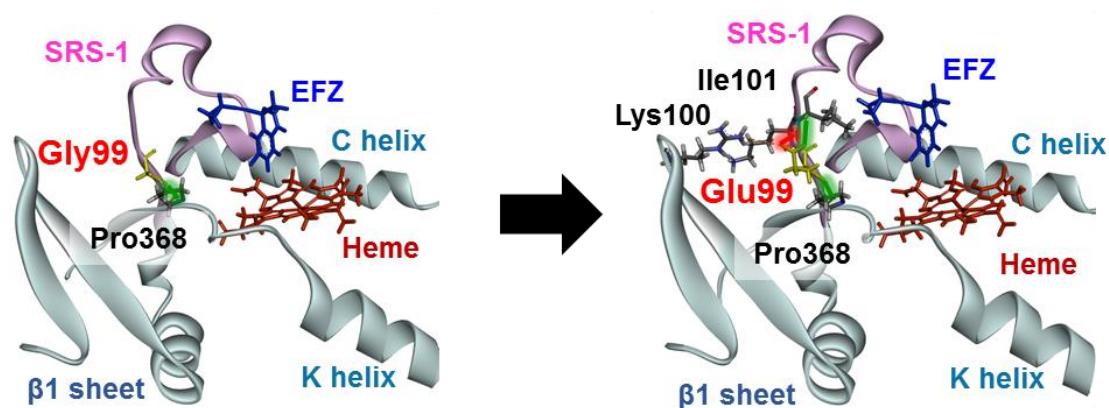


Fig. 26. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Gly99Glu (right panel) coordinated with EFZ. Gly99 and Glu99 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and attractive charge interaction are shown in green and red lines, respectively.

### Arg140Gln (CYP2B6.14)

Arg140Gln は C/D ループ上に位置している。いずれのアミノ酸もその近傍 Glu144、Arg145 及び Glu148 と電荷相互作用または水素結合を形成している。アミノ酸置換により電荷相互作用の解離が認められたものの、他のアミノ酸残基との相互作用変化は確認されなかった (Fig. 27)。

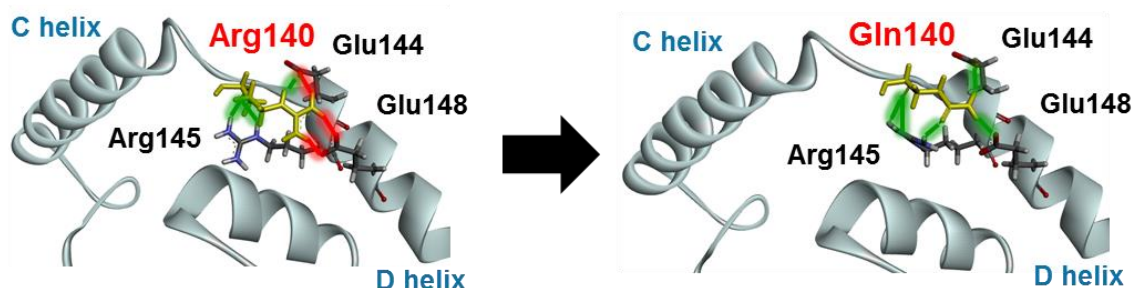


Fig. 27. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Arg140Gln (right panel) coordinated with EFZ. Arg140 and Gln140 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and attractive charge interactions are shown in green and red lines, respectively.

#### Ile391Asn (CYP2B6.15)

Ile391Asn は  $\beta 1$  ストランド上に位置しており、複数のアミノ酸と相互作用することにより  $\beta 1$  シート構造の形成に関与していることが考えられる。アミノ酸置換により、ヘム近傍 SRS-5 上の Met365 との疎水性相互作用の消失を認めた。これにより、 $\beta 1$  シート及びヘム近傍における著しい立体構造変化が確認された (Fig. 28)。

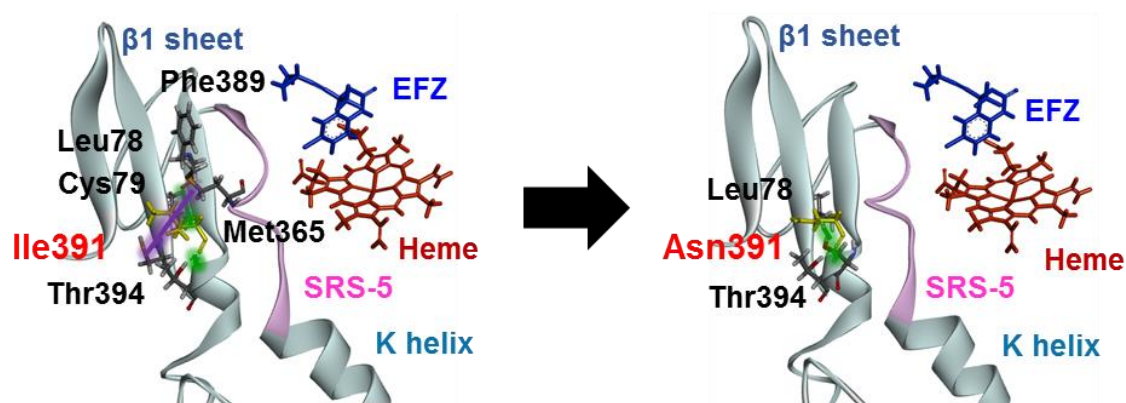


Fig. 28. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Ile391Asn (right panel) coordinated with EFZ. Ile391 and Asn391 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and alkyl interaction are shown in green and purple lines, respectively.

### Ile328Thr (CYP2B6.16、CYP2B6.18)

Ile328Thr は I ヘリックス上に位置し、いずれのアミノ酸もその近傍 Tyr325、Val331、Ile332、Gly333 及び Tyr325 と水素結合または疎水性相互作用を形成している。アミノ酸置換により Val324 と新たに水素結合が形成され、相互作用変化によるヘム近傍 I ヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 29)。

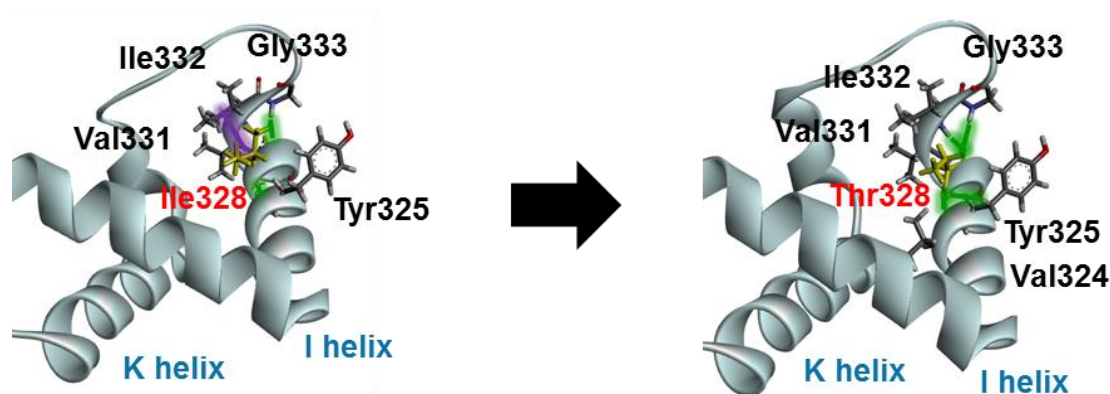


Fig. 29. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Ile328Thr (right panel) coordinated with EFZ. Ile328 and Thr328 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and alkyl interaction are shown in green and purple lines, respectively.

### Arg336Cys (CYP2B6.19)

Arg336Cys は J ヘリックス近傍に位置し、いずれのアミノ酸もその近傍 Pro337 及び L ヘリックス上の Gln455 と水素結合を形成している。アミノ酸置換により K ヘリックス上の Glu339 及び Asp342 との電荷相互作用の消失を認めた。これにより、H ヘリックス及び K ヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 30)。



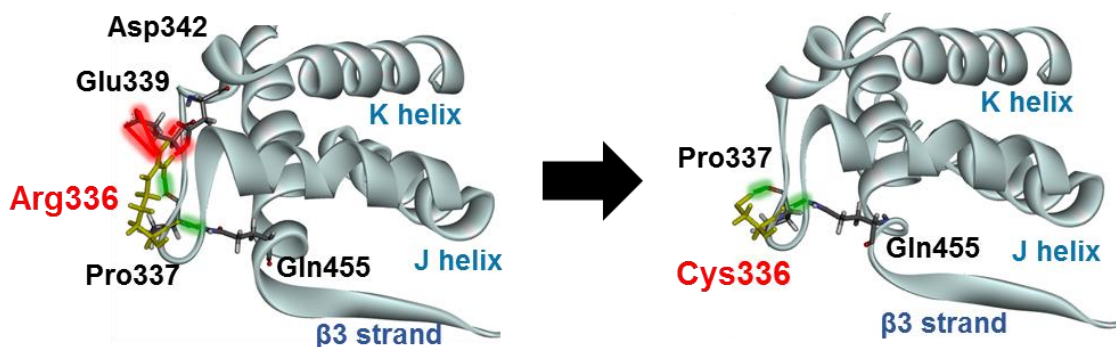


Fig. 30. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Arg336Cys (right panel) coordinated with EFZ. Arg336 and Cys336 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and attractive charge interactions are shown in green and red lines, respectively.

#### Thr168Ile (CYP2B6.20)

Thr168Ile は E ヘリックス近傍に位置し、いずれのアミノ酸もその近傍 Asp166 と水素結合を形成している。Thr168Ile は CYP2B6 バリエントの中でも CYP2B6.20 のみに認められ、同時に Gln172His 及び Lys262Arg を有する。これにより、Ile168 と His172 との新たな水素結合形成を認め、E ヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 31)。

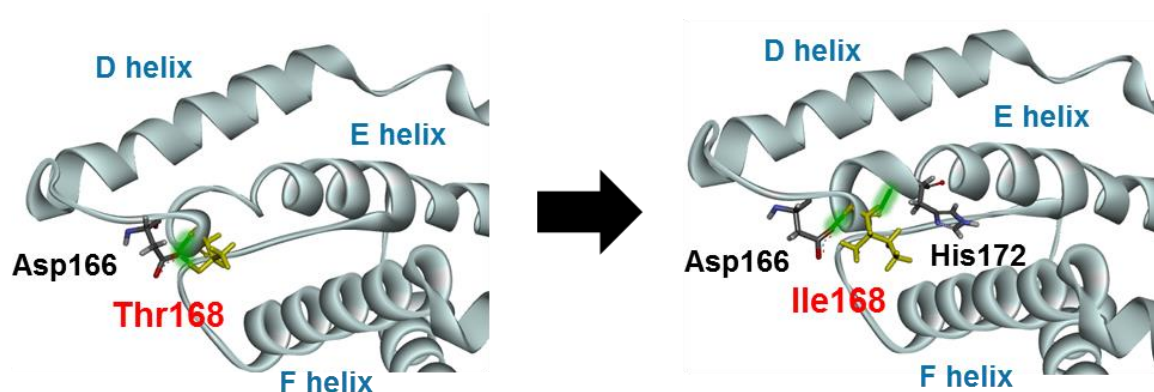


Fig. 31. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Thr168Ile (right panel) coordinated with EFZ. Thr168 and Ile168 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds are shown in green lines.

### Pro428Thr (CYP2B6.21)

Pro428Thr はヘム近傍に位置している。いずれのアミノ酸もその近傍 Phe426 と水素結合または  $\pi$  結合を形成しているが、アミノ酸置換により L ヘリックス上の Arg443 との水素結合形成を認めた。これにより、ヘム近傍 L ヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 32)。

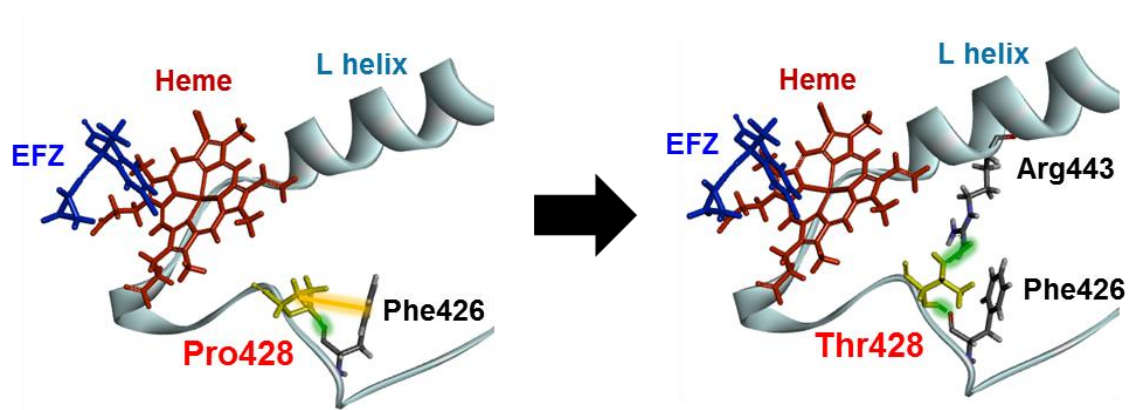


Fig. 32. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Pro428Thr (right panel) coordinated with EFZ. Pro428 and Thr428 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and pi-anion interaction are shown in green and mustard lines, respectively.

### Met459Val (CYP2B6.23)

Met459Val は  $\beta 3$  ストランド上に位置し、いずれのアミノ酸も Phe311、Arg487 及び Phe488 と  $\pi$  結合または水素結合を形成している。アミノ酸置換により I ヘリックス上の Leu315 との疎水性相互作用を認め、 $\beta 3$  シート及び I ヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 33)。

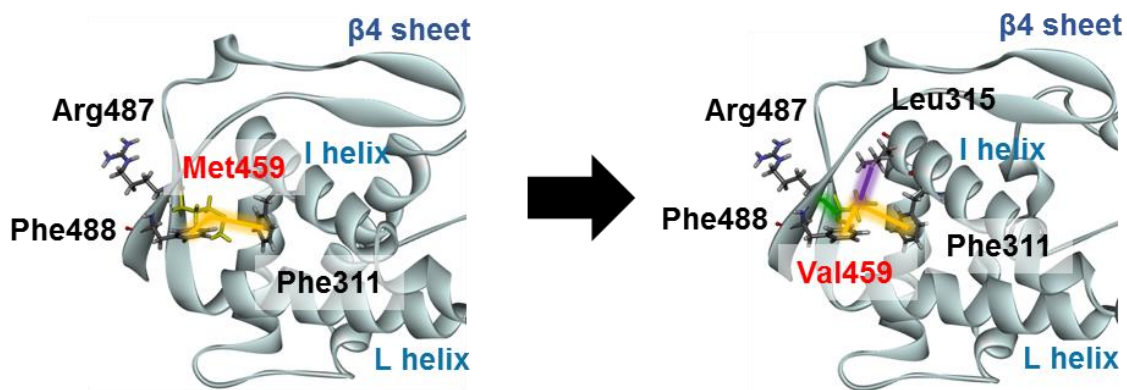


Fig. 33. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Met459Val (right panel) coordinated with EFZ. Met459 and Val459 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds, alkyl interaction, and pi-anion interactions are shown in green and purple, and mustard lines, respectively.

#### Gly476Asp (CYP2B6.24)

Gly476 はヘム近傍の SRS-6 に位置し、いずれのアミノ酸も SRS-5 に位置している Pro364 と水素結合を形成している。アミノ酸置換により Fヘリックス上の Ser210 との水素結合解離を認めた。これにより、ヘムを取り巻く SRS の立体構造変化が確認された (Fig. 34)。

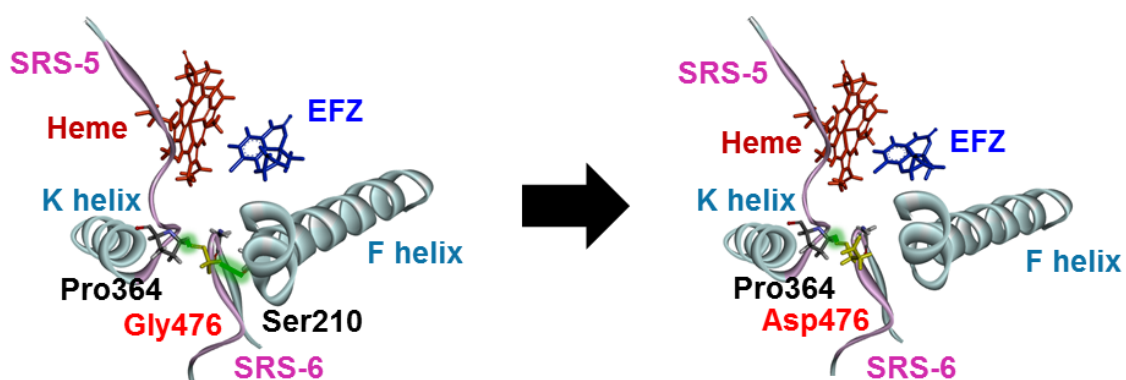


Fig. 34. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Gly476Asp (right panel) coordinated with EFZ. Gly476 and Asp476 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds are shown in green lines.



### Gln485Leu (CYP2B6.25)

Gln485Leu は  $\beta 3$  シート近傍に位置し、いずれのアミノ酸も Met165 及び Pro462 と水素結合を形成している。アミノ酸置換によりその近傍 Leu164 との新たな疎水性相互作用及び水素結合形成を認め、E ヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 35)。

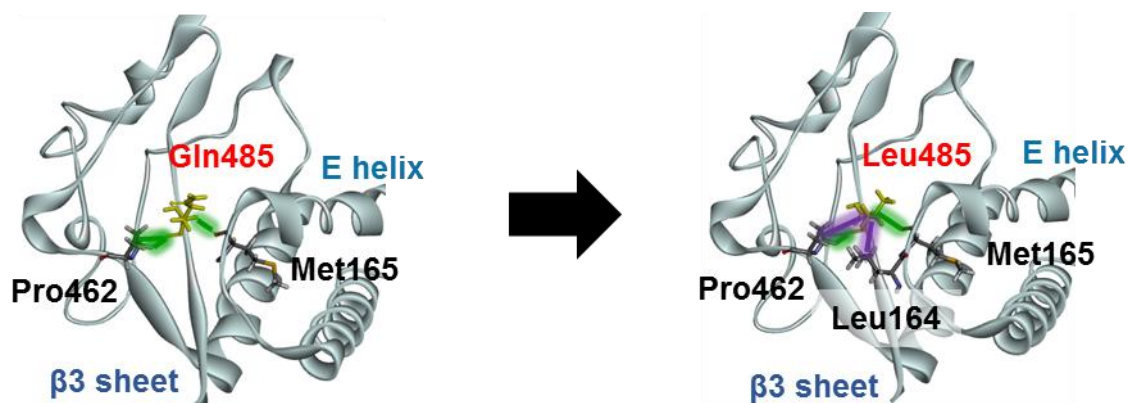


Fig. 35. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Gln485Leu (right panel) coordinated with EFZ. Gln485 and Leu485 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and alkyl interactions are shown in green and purple lines, respectively.

### Pro167Ala (CYP2B6.26)

Pro167Ala は E ヘリックス上に位置し、いずれのアミノ酸もその近傍 Leu170 及び Phe171 と水素結合を形成している。アミノ酸置換により I ヘリックス上の Arg308 との疎水性相互作用が認められた。これにより、ヘム近傍 I ヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 36)。

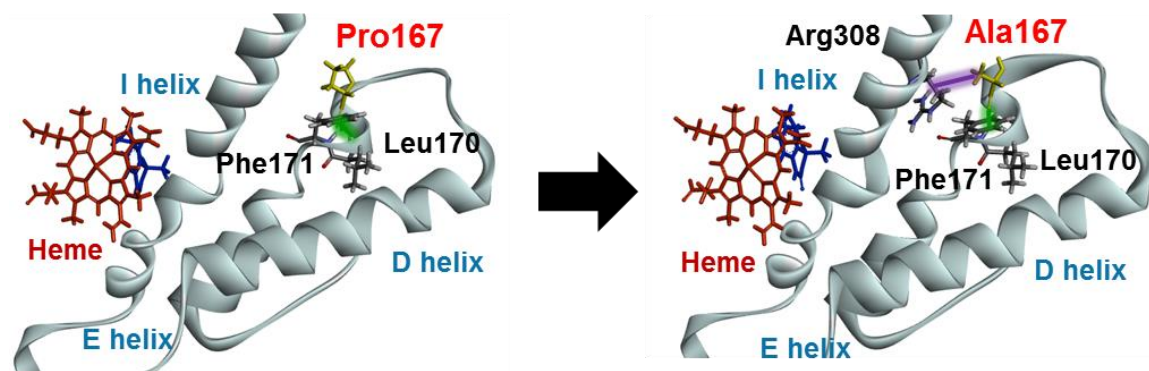


Fig. 36. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Pro167Ala (right panel) coordinated with EFZ. Pro167 and Ala167 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and alkyl interaction are shown in green and purple lines, respectively.

#### Met198Thr (CYP2B6.27、CYP2B6.35)

Met198Thr は F ヘリックス上に位置し、いずれのアミノ酸も Glu194、Phe195 及び Leu201 と  $\pi$  結合または水素結合を形成している。アミノ酸置換によりその近傍 Phe202 と G ヘリックス上の Tyr244 との  $\pi$  結合解離が認められた。これにより、F ヘリックスから G ヘリックスにいたるまでの立体構造変化が確認された (Fig. 37)。

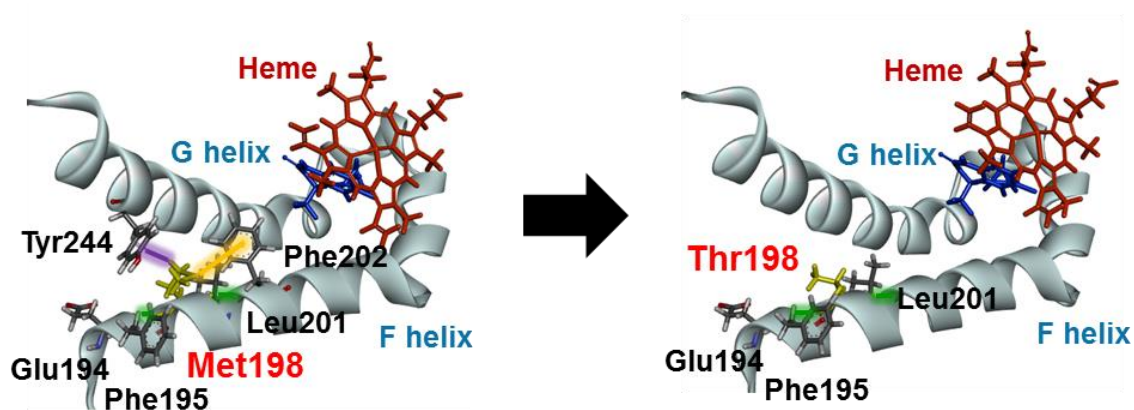


Fig. 37. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Met198Thr (right panel) coordinated with EFZ. Met198 and Thr198 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and alkyl interaction, and pi-anion interaction are shown in green, purple, and mustard lines, respectively.

### Leu313Ile (CYP2B6.31)

Leu313Ile は I ヘリックス上に位置し、いずれのアミノ酸も Tyr309、Phe408 及び Leu470 と  $\pi$  結合を含む疎水性相互作用を形成している。このアミノ酸置換による他のアミノ酸残基との相互作用変化は確認されなかった (Fig. 38)。

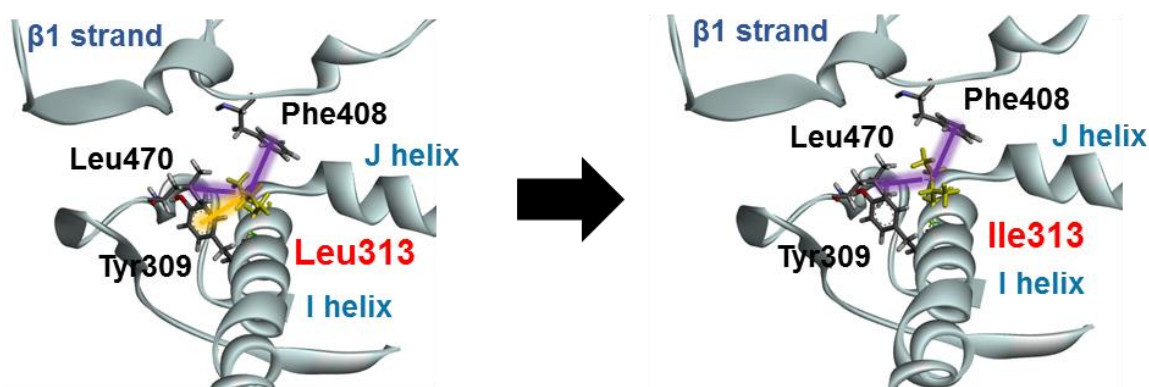


Fig. 38. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Leu313Ile (right panel) coordinated with EFZ. Leu313 and Ile313 residues are shown in yellow. Alkyl interactions and pi-anion interaction are shown in purple and mustard lines, respectively.

### Ala407Thr (CYP2B6.32)

Ala407Thr は  $\beta$ 1 シート近傍に位置し、いずれのアミノ酸も Arg358、Lys404 及び Asp406 と水素結合または疎水性相互作用を形成している。このアミノ酸置換による他のアミノ酸残基との相互作用変化は確認されなかった (Fig. 39)。

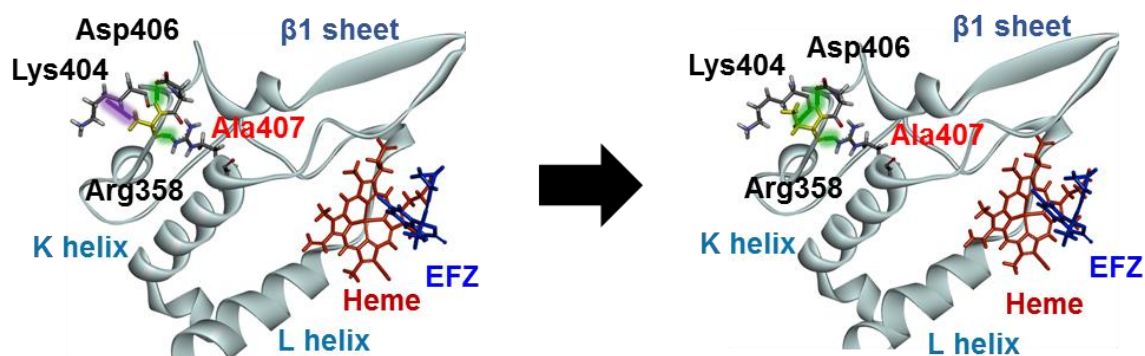


Fig. 39. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Ala407Thr (right panel) coordinated with EFZ. Ala407 and Thr407 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and alkyl interaction are shown in green and purple lines, respectively.

#### Arg487Ser (CYP2B6.33、CYP2B6.34)

Arg487Ser は  $\beta 3$  ストランド上に位置し、いずれのアミノ酸も Met459 及び Ala460 水素結合を形成している。Arg487 は Leu164 と電荷相互作用を、Ser461 と水素結合をそれぞれ形成しているのに対し、アミノ酸置換によりこれらの結合が消失し、新たに Gly162 との水素結合の形成が認められた。これら複数の相互作用変化により、 $\beta 3$  シートの立体構造変化が確認された (Fig. 40)。

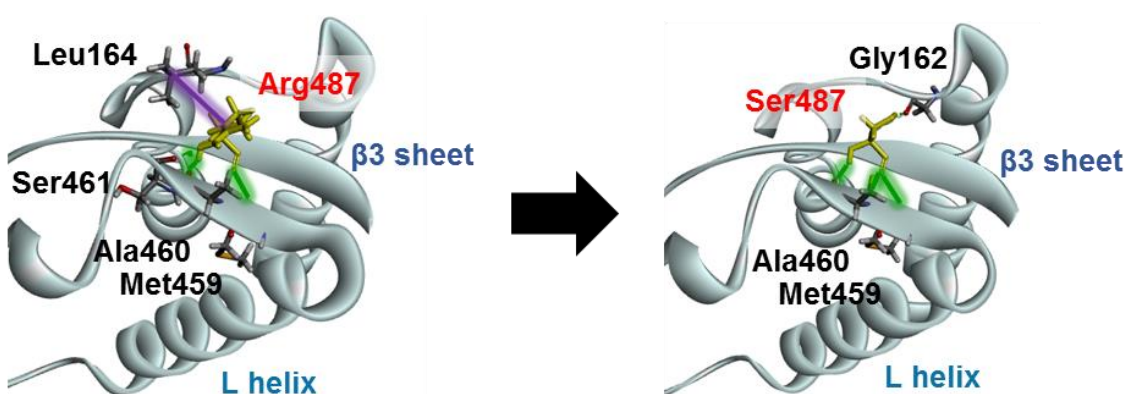


Fig. 40. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Arg487Ser (right panel) coordinated with EFZ. Arg487 and Ser487 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and alkyl interaction are shown in green and purple lines, respectively.

### Gly110Val、Ile114Thr (CYP2B6.35)

Gly110Val 及び Ile114Thr はいずれも C ヘリックス近傍に位置している。アミノ酸置換により、Val110 は Asp105 と水素結合を、Arg112 及び Ala116 と疎水性相互作用をそれぞれ形成していた。さらに Thr114 においては、基質である EFZ との水素結合が認められた。これにより、C ヘリックス近傍の立体構造変化及び基質のヘムとの結合阻害が確認された (Fig. 41)。

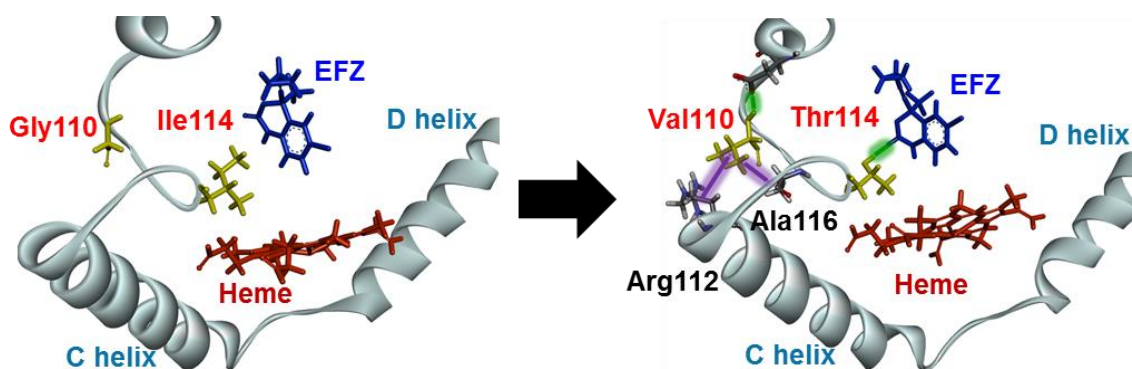


Fig. 41. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Gly110Val/Ile114Thr (right panel) coordinated with EFZ. Gly110, Ile114, Val110 and Thr114 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and alkyl interactions are shown in green and purple lines, respectively.

### Glu148Asp (CYP2B6.35)

Glu148Asp はDヘリックス上に位置し、いずれのアミノ酸も Cys152 と水素結合を形成している。アミノ酸置換により、Eヘリックス上の Arg187 との電荷相互作用をはじめとする複数のアミノ酸残基において相互作用変化が生じた。これにより、Dヘリックス及びEヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 42)。



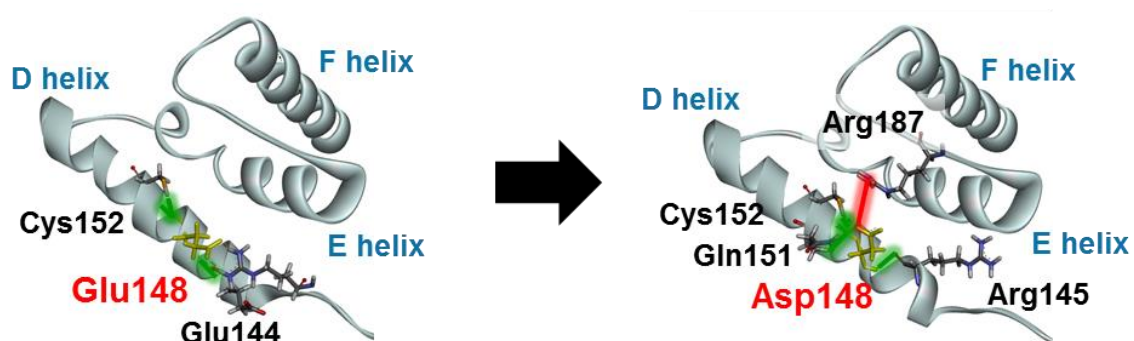


Fig. 42. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Glu148Asp (right panel) coordinated with EFZ. Glu148 and Asp148 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and attractive charge interaction are shown in green and red lines, respectively.

#### Ala279Pro (CYP2B6.35)

Ala279Pro は H ヘリックス近傍に位置しており、いずれのアミノ酸も Asn278 と水素結合を形成している。このアミノ酸置換による他のアミノ酸残基との相互作用変化は確認されなかった (Fig. 43)。

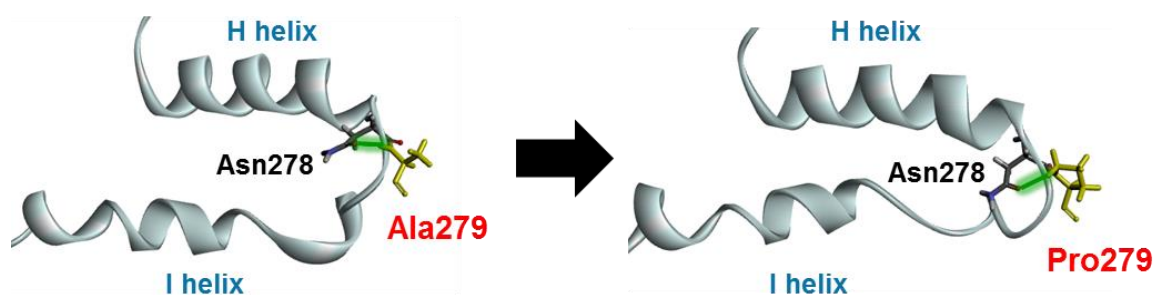


Fig. 43. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Ala279Pro (right panel) coordinated with EFZ. Ala279 and Pro279 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds are shown in green lines.

### Val183Gly (CYP2B6.37)

Val183Gly は、ヘム近傍 E ヘリックス上に位置し、いずれのアミノ酸も Ile179 及び Ile265 と疎水性相互作用または水素結合を形成している。他のアミノ酸との新たな相互作用変化は認められなかったが、ヘム近傍の立体構造変化が確認された (Fig. 44)。

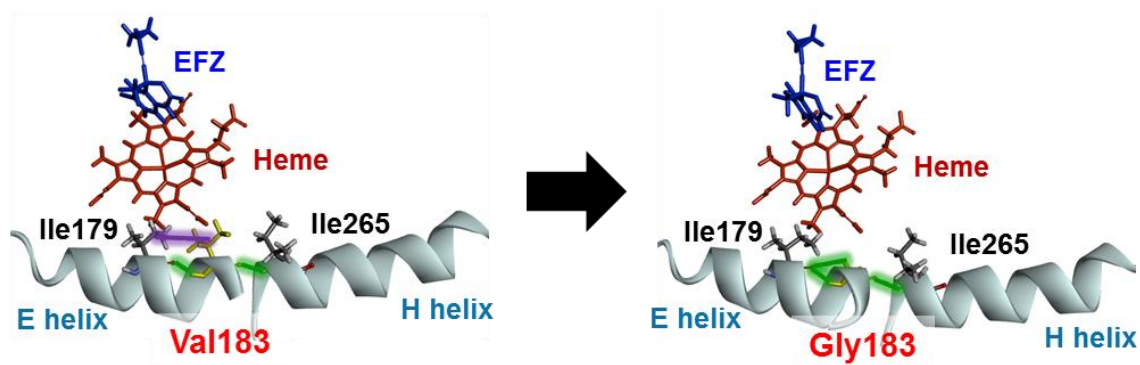


Fig. 44. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Val183Gly (right panel) coordinated with EFZ. Val183 and Gly183 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and alkyl interaction are shown in green and purple lines, respectively.

### Arg35Cys (レアバリエント 1)

Arg35Cys は  $\beta 1$  ストランド近傍に位置し、アミノ酸置換により Gln45 との水素結合消失ならびに Asn42 との新たな水素結合形成が認められた。この 2 つのアミノ酸はいずれも  $\beta 1$  ストランド上に位置しており、 $\beta 1$  シートの立体構造変化が確認された (Fig. 45)。

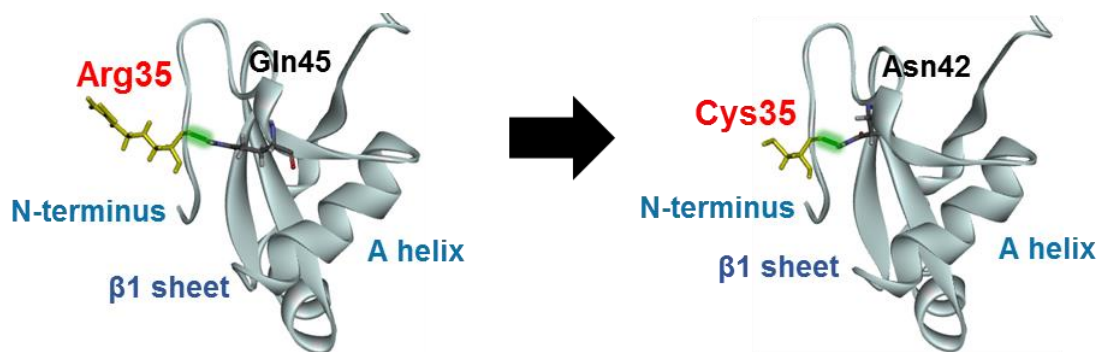


Fig. 45. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Arg35Cys (right panel) coordinated with EFZ. Arg35 and Cys35 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds are shown in green lines.

#### Arg145Trp (レアバリエント 2)

Arg145Trp は D ヘリックス上に位置している。Arg145 に関して、周辺のアミノ酸 Arg140、Ser141、Glu149、Ser181 及び Lys262 と水素結合ネットワークを形成しているのに対し、Trp145 ではそれらのネットワークが解消されていた。これにより、D ヘリックス及び E ヘリックスの著しい立体構造変化が確認された (Fig. 46)。

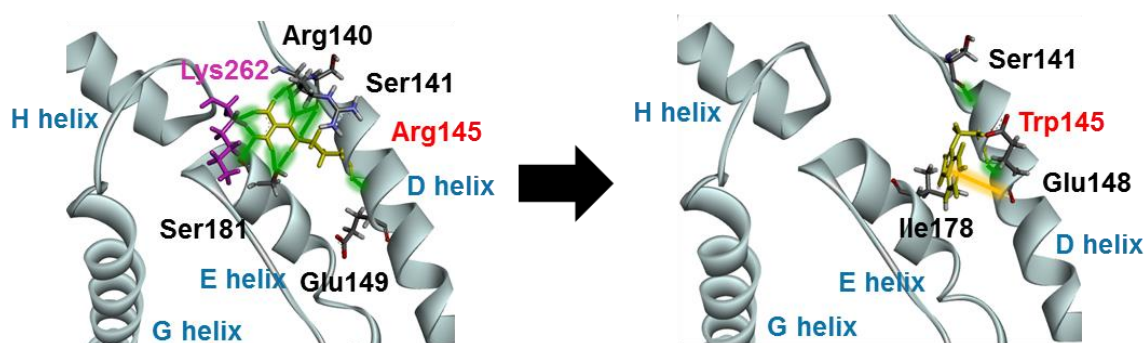


Fig. 46. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Arg145Trp (right panel) coordinated with EFZ. Arg145 and Trp145 residues are shown in yellow. Lys262 residue is shown in purple. Hydrogen bonds and pi-anion interaction are shown in green and mustard lines, respectively.



### Arg158Gly (レアバリエント 3)

Arg158Gly は D ヘリックス上に位置し、いずれのアミノ酸も Ile154 及び Lys161 と水素結合を形成している。アミノ酸置換により D ヘリックス上の Glu155 との水素結合解離が認められた。これにより、D ヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 47)。



Fig. 47. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Arg158Gly (right panel) coordinated with EFZ. Arg158 and Gly158 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds are shown in green lines.

### Glu339Asp (レアバリエント 4)

Glu339Asp は K ヘリックス近傍に位置し、いずれのアミノ酸も His341 及び Asp342 と水素結合を形成している。アミノ酸置換により J ヘリックス近傍の Arg336 との電荷相互作用が消失し、新たに Leu340 と水素結合が認められた。これにより、K ヘリックス及び J ヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 48)。

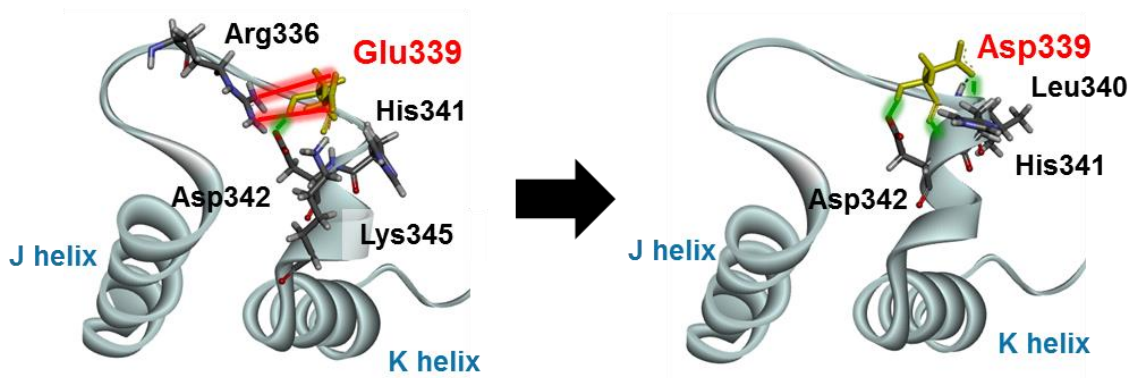


Fig. 48. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Glu339Asp (right panel) coordinated with EFZ. Glu339 and Asp339 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and attractive charge interactions are shown in green and red lines, respectively.

#### Tyr380His (レアバリエント 5)

Tyr380His は  $\beta 1$  ストランド上に位置し、いずれのアミノ酸も Phe377 と水素結合を形成している。アミノ酸置換により、その近傍及び  $\beta 1$  シート上複数のアミノ酸残基との相互作用が変化していることが確認された (Fig. 49)。

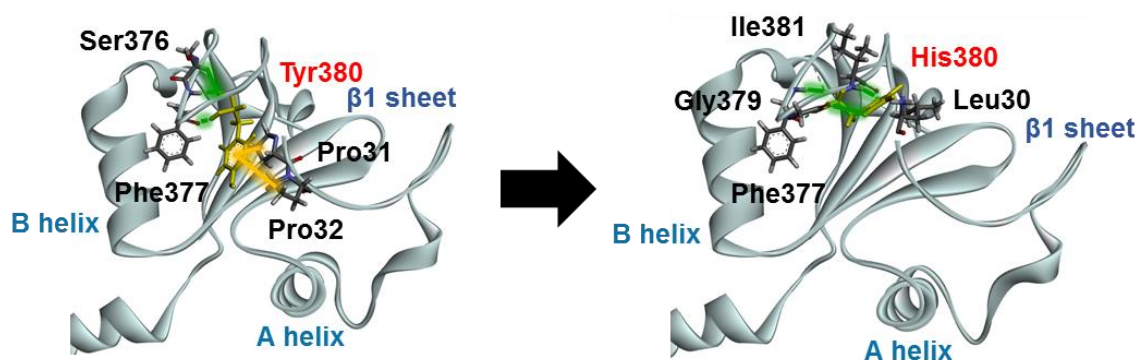


Fig. 49. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Tyr380His (right panel) coordinated with EFZ. Tyr380 and His380 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and pi-anion interactions are shown in green and mustard lines, respectively.

### Ile382Asn (レアバリエント 6)

Ile382Asn は  $\beta 1$  シートの構成に関与していることが確認された。いずれのアミノ酸も Pro31、His374 及び Thr375 と疎水性相互作用及び水素結合を形成している。アミノ酸置換により、Val76 及び Val371 との疎水性相互作用の消失が認められた。これにより、 $\beta 1$  シートの立体構造変化が確認された (Fig. 50)。

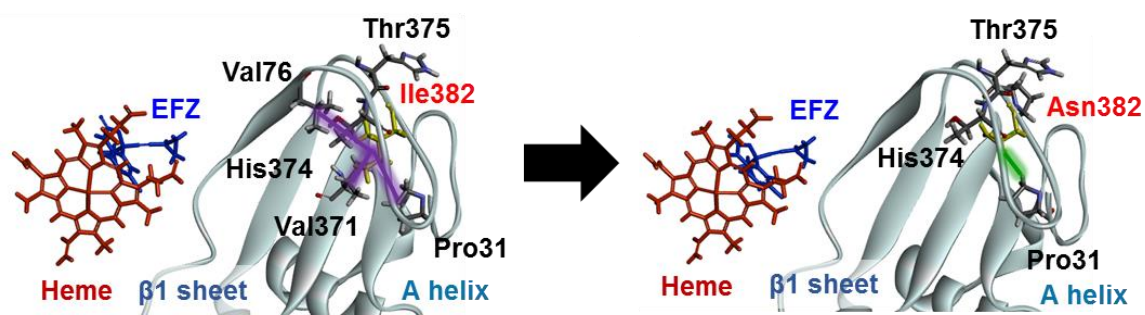


Fig. 50. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Ile382Asn (right panel) coordinated with EFZ. Ile382 and Asn382 residues are shown in yellow. Hydrogen bond and alkyl interactions are shown in green and purple lines, respectively.

### Arg443Cys (レアバリエント 7)

Arg443Cys は L ヘリックス上に位置し、いずれのアミノ酸も Glu439 及び Phe447 と水素結合または電荷相互作用を形成している。アミノ酸置換により、K ヘリックス上の Gln357 との水素結合解離が認められた。これにより、ヘム近傍の L ヘリックス及び K ヘリックスの立体構造変化が確認された (Fig. 51)。

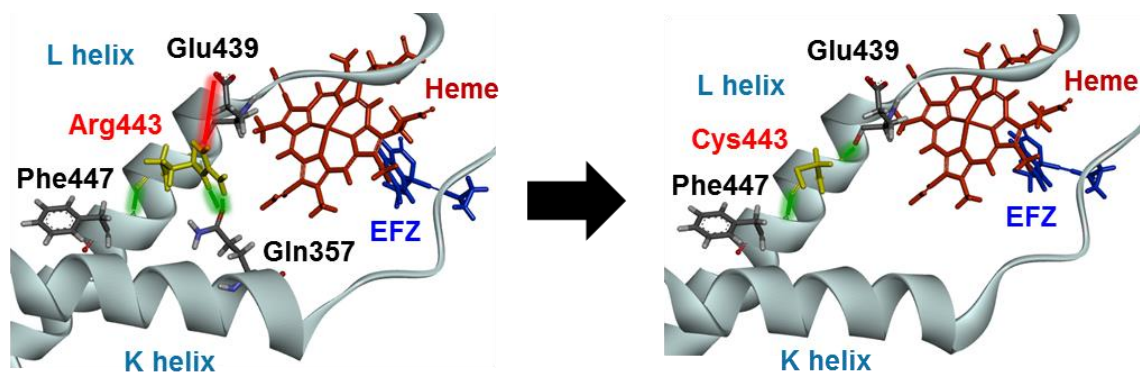


Fig. 51. Diagram of a portion of the crystal structure of CYP2B6.1 (left panel) and Arg443Cys (right panel) coordinated with EFZ. Arg443 and Cys443 residues are shown in yellow. Hydrogen bonds and attractive charge interaction are shown in green and red lines, respectively.

## 第八節 考察

CYP2B6 は、臨床で使用する様々な医薬品の代謝に関与する重要な薬物代謝酵素である。CYP2B6 遺伝子の多型性は、抗 HIV 薬をはじめ多くの薬物代謝反応の個人差の要因となると考えられている。本研究では、40 種類の 293FT 細胞発現 CYP2B6 バリエントタンパク質に対し、酵素反応速度論的解析を行うことで網羅的に酵素機能変化を評価した。EFZ 8 位水酸化反応において、野生型及び 24 種類のバリエントで反応速度論的パラメータを算出することができた。一方、15 種類のバリエントでは、基質濃度最高点においても代謝物は検出されず酵素反応速度論的パラメータは算出できなかった。野生型と比較して、6 種類のバリエントで  $CL_{int}$  値の有意な低下、6 種類のバリエントで  $CL_{int}$  値の有意な上昇を認めた。さらに、7-ETC O-脱エチル化反応に対し同様に酵素反応速度論的パラメータを算出した結果、野生型と比較して  $CL_{int}$  値の有意な変化は認められなかったものの、EFZ 代謝反応における各バリエントの酵素活性変化と有意な相関が認められた。また、各 CYP2B6 バリエントで生じるアミノ酸置換に対しては、3D ドッキングシミュレーションモデル解析を行い、酵素機能変化の分子メカニズム解明を試みた。

40 種類のバリエントのうち、15 種類ではウェスタンブロット法においてその発現を確認できたにもかかわらず、酵素活性が消失する結果となった。これらのうち 11 種類のバリエント (CYP2B6.11、.12、.15、.16、.18、.21、.24、Arg378Ter、.37、Ile382Asn 及び Arg443Cys) では、CO 差スペクトル測定法においてホロ P450 含量は測定できず、機能タンパク質の消失が推測された。これらのうち 6 種類 (CYP2B6.12、.15、.21、.24、.37 及び Arg443Cys) において、ヘム近傍におけるアミノ酸置換あるいは相互作用変化が認められ、P450 タンパク質の補因子であるヘム周辺の立体構造変化がホロ P450 の形成に影響を及ぼし、酵素活性の消失に関与したものと考えられた[82]。CYP2B6.11 はプロリンリッチ領域近傍のアミノ酸置換 (Met46Val) を生じる。このプロリンリッチ領域は、P450 分子種において高度に保存されており小胞体膜アンカーとヘム結合領域を繋ぐ重要な役割を担っている他、P450 構造のフォールディングに関与している[83, 84]。Met46Val により、ヘム周辺のタンパク質構造が著しく変化し、ホロ P450 の消失に伴う酵素活性の消失に関与してい

るものと考えられた。CYP2B6.16 及び CYP2B6.18 に共通のアミノ酸置換である Ile328Thr は、I ヘリックス上に位置しており、3D ドッキングシミュレーションモデル解析において、Val324 と新たな相互作用を認め、I ヘリックス構造の著しい変化が推測された。I ヘリックス構造は基質薬物の P450 への結合に重要な役割を担うことが報告されている[85, 86]。さらに Kobayashi らは CYP2B6.18 において、ヘムを取り巻く複数のヘリックス構造が野生型と著しく異なることを示唆している[87]。ヘム周辺の複数のヘリックス構造変化や本研究で確認された I ヘリックスの立体構造変化が、ホロ P450 の消失に伴う酵素活性の消失に関与するものと考えられた。また、CYP2B6\*28 に該当する Arg378Ter は終止コドンへの塩基置換により、途中でタンパク質翻訳が停止してしまうため、ホロ P450 及び酵素活性が消失したと考えられた。

酵素活性の消失を認めたその他 4 種類のバリエント (CYP2B6.8、.13、.35 及び Arg145Trp) は、CO 差スペクトル測定法によるホロ P450 含量が測定できたことから、ヘムタンパク質構成への影響は少なく、その他の著しい立体構造変化が酵素機能に影響を与えることが考えられた。加えて、これらのうち 3 種類のバリエント (CYP2B6.13、.35 及び Arg145Trp) は、420nm と 450nm に二峰性のピークを認めたことから、ホロ P450 から P420 への変性が生じていることが示唆された。CYP2B6.8 及び CYP2B6.13 に共通のアミノ酸置換である Lys139Glu は C/D ループ構造上に位置しており、CYP2 ファミリーにおいて高度に保存されている[88]。このループ構造は薬物代謝反応に重要な役割を担うことが報告されており、Zhang らは、酸化還元反応に必要な電子の輸送が Lys139Glu によって制御され、その結果代謝活性が消失することを示唆している[89]。また、Gay らは、C/D 及び G/H ループ構造間の相互作用が CYP2B6 タンパク質の電子伝達系に影響を及ぼすことを示唆しており[90]、本研究における Lys139Glu に対する 3D ドッキングシミュレーションモデル解析では、G/H ループ構造上 Pro261 との疎水性相互作用及び H ヘリックス上 Thr267 との水素結合解離が認められた。この 2 つのループ構造間相互作用の変化が、ヘムへの電子供給を阻害し酵素活性の消失に関与したものと考えられた。さらに、CYP2B6.35 は複数の遺伝子多型に由来するアミノ酸置換が生じており、その中でも Gly110Val 及び Ile114Thr は SRS-1 上に位置している。Radloff らは、COS-1 細胞を用いてブプロピオン及び EFZ 代謝活性に対するこれらのアミノ酸置換

の影響を検討しており、いずれも酵素活性が消失することが報告されている[49]。本研究における 3D ドッキングシミュレーションモデル解析では C ヘリックス上の Arg112 及び Ala116 との新たな疎水性相互作用を認め、それに伴い Thr114 と EFZ との水素結合形成が確認された。これらの結果から、SRS-1 周辺の立体構造変化に伴う代謝反応の阻害が、酵素活性消失に関与したものと考えられた。

EFZ 代謝活性に対し酵素反応速度論的パラメータが算出できた CYP2B6.1 及び 24 種類のバリエーション酵素について、それらは全て CO 差スペクトル測定法において 450nm に吸収極大が得られ、ホロ P450 を定量することができた。これらのうち 8 種類のバリエーション (CYP2B6.10、.17、.19、.20、.26、.27、.33 及び Glu339Asp) は、420nm と 450nm に二峰性のピークを認めたことから、アミノ酸置換によるホロ P450 から P420 への変性が生じていることが示唆された。その中でも、EFZ 代謝反応における  $CL_{int}$  値の有意な低下 (51%) が認められた CYP2B6.10 は、膜結合領域にアミノ酸置換が生じるため、小胞体膜への結合が不安定となり、P420 への変性に繋がったものと考えられた[91, 92]。CYP2B6.14 では、野生型と比較して  $K_m$  値が 1.8 倍と有意に上昇し、それに伴う  $CL_{int}$  値の有意な低下 (22%) が認められた。Lang らは、ブプロピオン水酸化活性において同様に CYP2B6.14 の酵素活性低下 (13%) を報告している[88]。CYP2B6.14 で生じる Arg140Gln は C/D ループ構造上に位置しており、アミノ酸置換による他のアミノ酸残基との相互作用変化は認められなかった。しかし、Arg140 は CYP2 ファミリーにおいて高度に保存されるアミノ酸であり[88]、C/D ループ構造上のアミノ酸置換が P450 タンパク質構造に影響を及ぼし、基質親和性の低下に伴う  $CL_{int}$  値の低下に起因したと考えられた。加えて、Gln172His、Lys262Arg 及び Arg336Cys のアミノ酸置換を生じる CYP2B6.19 は EFZ 代謝活性において、野生型と比較して  $CL_{int}$  値が 37%に減少した。さらに、CYP2B6.19 は CO 差スペクトル測定法において唯一ホロ P450 含量の有意な低下を認めたことから、J ヘリックス近傍の Arg336Cys が機能タンパク質発現及び  $CL_{int}$  値の低下に関与したものと考えられた。

Gln172His 及び Lys262Arg は、多くの CYP2B6 バリエーションで生じる共通のアミノ酸置換である。この 2 種類のアミノ酸置換を有する CYP2B6\*6 は、様々な人種や民族集団で検出され、その頻度

は 15%から 60%に及ぶ[26]。EFZ8 位水酸化活性測定において CYP2B6.6 は、野生型と比較して有意な  $V_{\max}$  値の上昇 (2.8 倍) とそれに伴う  $CL_{\text{int}}$  値の上昇 (2.7 倍) を認めた。この CYP2B6.6 に関して、複数の哺乳動物細胞発現 CYP2B6 を用いた *in vitro* 解析が行われており、Jinno らは 7-ETC O-脱エチル化活性において  $CL_{\text{int}}$  値の有意な上昇 (1.9 倍) を報告し[48]、Radloff らも同様に EFZ を基質薬物とした場合に  $CL_{\text{int}}$  値の有意な上昇 (1.8 倍) を報告している[49]。今回の EFZ 代謝活性に対する CYP2B6.6 酵素機能変化は、これまでの *in vitro* 解析における複数の基質薬物における  $CL_{\text{int}}$  値上昇と一致する結果となった。この 2 箇所のアミノ酸置換に関して、これまで複数の *in silico* 解析が行われており、酵素機能変化に及ぼす影響が考察されてきた[93-97]。Gay らは Lys262Arg による立体構造の変化が酵素活性上昇の関与を示唆しており、Arg262 とその周辺の複数のアミノ酸残基との水素結合ネットワークの形成が、G ヘリックス上複数のアミノ酸残基との結合形成に伴う構造安定化に関与していることを報告している[90]。また、本研究では、この 2 種類のアミノ酸置換を有する CYP2B6.7、.26 及び.34 において、野生型と比較して  $CL_{\text{int}}$  値が有意に上昇する結果となった。3D ドッキングシミュレーションモデル解析の結果、Gln172His では Thr302 を取り巻く複数のアミノ酸残基との新たな相互作用形成により、強固な結合ネットワークを形成することを確認した。Thr302 は、基質薬物の CYP2B6 へのドッキングや触媒反応に重要な役割を担うことが報告されており、P450 分子種の中でも高度に保存されるアミノ酸残基である[81, 98, 99]。Thr302 周辺の立体構造の保持・安定化が酵素活性上昇を引き起こしたと考えられた。一方で、Lys262Arg は G/H ループ上に位置し、D ヘリックス上の Arg145 及び G/H ループ上の Asp263 と新たな電荷相互作用及び水素結合形成を認めた。これにより、C/D 及び G/H ループ構造間の強固な結合形成に伴う立体構造の保持・安定化が推測された。前述のように、これらのループ構造は電子伝達に重要な役割を担うことが示唆されている[90]。以上のことから、2 箇所のアミノ酸置換に伴う立体構造の変化が相乗効果となって、代謝活性を増強させることが考えられた。

しかし、CYP2B6\*6 に関して、今回のような *in vitro* 解析結果とこれまでの *in vivo* 試験データには大きな矛盾が生じる。CYP2B6\*6 バリエントアレルをホモ接合体で有する患者群では、EFZ の血中濃度上昇に伴い、副作用発現の危険性や AIDS 治療の断念が危惧されている[27-31]。この矛



盾には、Gln172His を引き起こすゲノム上の遺伝子多型が関与しており、15631G>T によりエキソン 4-6 までの領域でスプライシング異常が生じる結果、機能タンパク質翻訳が制御され、酵素活性の低下が生じることが示唆されている[100, 101]。さらに Hofmann らは、特定のイントロン領域を含む Minigene プラスミドを用いた組換え CYP2B6 タンパク質発現系実験においても、15631G>T 多型がタンパク質発現量及び酵素活性の低下に関与することを示唆している[101]。今回、機能タンパク質自体の評価として CYP2B6\*6 の酵素活性上昇の程度や分子メカニズムを明らかにした。こういった *in vivo* 試験との矛盾を解消すべく、アミノ酸置換型の P450 タンパク質の機能解析データだけでなく、今後は、遺伝子多型に由来するタンパク質発現量の変化も詳細に解析する必要があると言える。

今回、アミノ酸置換を生じる既報 33 種類のバリエントアレルの他に、日本人集団において新たに同定された 7 種類のレアバリエントについても詳細な機能解析を行った。EFZ 代謝活性において、7 種類中 6 種類のバリエントで、CYP2B6.1 と比較し  $CL_{int}$  値の有意な低下あるいは酵素活性の消失を認めた。Arg35Cys は唯一酵素機能変化が認められなかったバリエントであり、アミノ酸置換による著しい立体構造変化は確認されなかった。一方で、3 種類のバリエント (Arg158Gly、Glu339Asp 及び Tyr380His) において  $CL_{int}$  値の有意な低下を認め、それぞれ D ヘリックス、J'ヘリックス及び  $\beta 2$  ストランド上のアミノ酸置換が酵素機能変化に関与することが考えられた。また、酵素活性が消失した 3 種類のうち 2 種類のバリエント (Ile382Asn 及び Arg443Cys) はホロ P450 含量が定量下限以下となった。Ile382Asn は  $\beta 1$  シートとの相互作用を認め、一方 Arg443Cys は L ヘリックス上に位置している。これらの構造は CYP2B6 タンパク質のヘム近傍に位置しており、ヘム周辺の立体構造変化が機能タンパク質及び酵素活性の消失に関与することが考えられた。ホロ P450 含量が定量できたにもかかわらず、酵素活性が消失した Arg145Trp は D ヘリックス上に位置しており、立体構造の変化が酵素機能に影響を及ぼすことが考えられた。Arg145 は、前述した Lys262 と水素結合を形成している。アミノ酸置換により、Lys262 との水素結合が解消され G/H ループ構造が著しく変化することが推測された。電子伝達に重要な役割を担う G/H ループ構造の変化が酵素活性の消失に関与しているものと考えられた。これら  $CL_{int}$  値の低下あるいは酵素活性の

消失を認めたバリエントアレルを有する日本人では、低活性群として医薬品の体内動態に影響が及ぶ可能性が示唆された。

今回の網羅的解析において、野生型を含めた 40 種類の CYP2B6 バリエントのうち、15 種類のバリエントで酵素活性が消失することが明らかとなった。このうち 11 種類のバリエントではホロ P450 が定量下限以下となりヘム近傍の立体構造変化が機能タンパク質の消失に関与するものと考察された。また、その他 4 種類の酵素活性が消失したバリエントでは、C/D 及び G/H ループ構造の変化や基質との結合、水素結合ネットワークの解消といった著しい立体構造の変化が活性消失に起因するものと考察された。また、6 種類のバリエントにおいて野生型と比較して  $CL_{int}$  値の有意な低下を認め、CYP2B6 タンパク質発現量の低下や  $K_m$  値の上昇を認めたことから、タンパク安定性の低下や基質親和性の低下が関与しているものと考えられた。 $CL_{int}$  値の有意な上昇を認めた 6 種類のうち 4 種類のバリエントでは、遺伝子多型に伴うスプライシング異常から、ヒトの生体内における CYP2B6 バリエント酵素の機能低下が予想される。これら酵素活性の消失、低下を認めたバリエントに加え、15631G>T をホモ接合体で有するヒトでは、CYP2B6 で代謝される医薬品の血中濃度が上昇し副作用発現のリスクが増大する可能性が考えられ、一方、 $CL_{int}$  値の上昇を認めた 2 種類のバリエントでは薬効の減弱が予想されるものと考察された。さらに、各 CYP2B6 バリエントで、異なる基質薬物において代謝活性の変化に基質特異性が存在するか否かを検証した結果、7-ETC O-脱エチル化反応から得られた各 CYP2B6 バリエントの  $CL_{int}$  値は、EFZ 8 位水酸化反応におけるそれぞれの  $CL_{int}$  値と高い相関を示した。臨床で広く使用される医薬品と *in vitro* における酵素活性プローブ薬における高い相関性より、様々な基質薬物に対する CYP2B6 遺伝子多型によるバリエント酵素機能変化評価系の指標となり得るものと考えられた。

## 総括

**CYP2B6** 遺伝子の多型性が患者個々の医薬品反応性に影響を及ぼし、遺伝子多型に由来する酵素タンパク質の機能や発現量の変化が薬物代謝能の個人差に関与することが明らかとなっている。これまでの研究を受け、**CYP2B6** で代謝される複数の医薬品の添付文書や治療ガイドラインでは、遺伝子多型を考慮した医薬品投与量の変更が推奨されている。しかし、多様な遺伝的多型性であるにも関わらず、高頻度に検出されるものや民族集団特異的な遺伝子多型のみ解析が進み、未だ酵素機能変化未解明なものも多く存在する。また本研究では、日本人集団に存在するレアバリエントが新規に 7 種類同定されたが、近年のゲノム解析技術の進歩に伴い、今後もこのような新規遺伝子多型が報告されることが予想される。**CYP2B6** で代謝される医薬品に対し、従来よりも安全かつ効果的な薬物療法を行うためには、患者毎の遺伝子多型情報を把握し、それらバリエント酵素の機能変化情報を活用した投与量調節が必要である。そのためには、**CYP2B6** 遺伝子多型による機能変化解析技術基盤を構築し、酵素機能変化情報を蓄積していくことが重要と考えられる。

本研究において、アミノ酸置換を伴う既報の 33 種類のバリエントに、日本人集団で新規に同定された 7 種類のレアバリエントを加えた計 40 種類の **CYP2B6** 遺伝子多型について、*in vitro* での網羅的な機能解析を行った。酵素反応速度論的解析に加え、2 種類の基質薬物において代謝活性変化に基質特異性が存在するか否かを検証し、さらに 3D ドッキングシミュレーションモデル解析を行うことで、これまで未解明であった酵素機能変化が生じる **CYP2B6** バリエントをはじめて明らかにした。今回の EFZ 代謝活性において、酵素活性が消失あるいは有意に低下した遺伝子多型を有するヒトでは、EFZ の血中濃度上昇と、それに伴う中枢神経障害等の副作用発現リスクの増大や AIDS 治療中断に繋がる可能性が考えられた。また、それぞれの **CYP2B6** バリエントについて、臨床で多く使用される医薬品 EFZ と *in vitro* における **CYP2B6** の酵素活性プローブ薬 7-ETC における酵素活性変化の高い相関性から、今回の機能変化情報は様々な基質薬物に対する酵素機能変化評価系の指標となり得るものと考えられた。さらに、3D ドッキングシミュレーションモデル解析において酵素機能変化のメカニズム解明を試みたことで、今後新たに報告される遺伝子多

型に伴う酵素機能変化の予測が可能になると考えられた。しかしながら、*CYP2B6* 遺伝子多型による薬物代謝活性変化情報を患者毎に適応するためには、今回のような *in vitro* 試験によるアミノ酸置換型 P450 タンパク質の機能解析データに加え、遺伝子多型に由来する *CYP2B6* タンパク質発現量変化の詳細な解析や、*in vivo* 試験による遺伝子型・表現型の関連性を今後さらに検証していく必要がある。

本研究の網羅的な解析が、酵素機能変化の一貫した評価・比較を可能とし、*CYP2B6* 遺伝子多型の機能解析技術基盤構築に繋がるものと考えられる。今後、本研究の解析結果を加えた *CYP2B6* 遺伝子多型の機能変化情報が蓄積され、遺伝子多型情報とリンクさせた情報基盤が構築されることが期待される。これにより、*CYP2B6* で代謝される医薬品による治療を行うにあたり、遺伝子多型情報の把握が患者個々の医薬品反応性の違いを考慮した投与量調節に繋がるものと考えられる。そして、本研究の機能変化情報や解析技術基盤が治療効果や副作用発現の予測精度を向上させた個別化薬物療法の臨床応用実現に大きく貢献することが期待される。

## 実験材料

### 1. 研究にあたっての倫理的配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言及び本邦における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した。東北大学大学院薬学研究科人を対象とする医学系研究に関する倫理委員会で承認された「薬効及び副作用発現に関わる薬物動態関連遺伝子多型の解析 (14-08)」に従って行われた。

### 2. リファレンス配列

CYP2B6 cDNA のリファレンス配列には、GenBank (AF182277) の NM\_000767 を用いた。

### 3. アレルの表記

アレルの表記は、CYP 命名委員会 (Pharmacogene Variation Consortium; <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2B6>) の表記に従った。

### 4. X線結晶構造解析モデル

CYP2B6 の X 線回折結晶構造解析モデルとして、Protein Data Bank の 3IBD を参考にした。

### 5. 統計学的解析

IBM SPSS Statistics Ver. 22.0 (IBM, NY, U.S.A.) を用いた。各 CYP2B6 バリエント酵素の発現量、EFZ 8 位水酸化活性及び 7-ETC O-脱エチル化活性比較において、Shapiro-Wilk 検定により正規性の検定を行った。正規分布に従った酵素反応速度論的パラメータについては Levene 検定により等分散性の検定を行った。等分散性が仮定されたパラメータについては一元配置分散分析を行った後の Dunnett t 法を用い、その他のパラメータについては Dunnett T3 法を用いた。正規分布に従わないバリエントについては Kruskal-Wallis の検定法を用いて野生型及びバリエント CYP2B6 の酵素活性を比較した。また、統計学的有意水準は  $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.005$  とした。

## 6. 試薬及び材料

本研究を実行するにあたり、以下の試薬及び材料を使用した。

100 bp DNA Ladder One	Watson
1 kb DNA Ladder One	Nippon Genetics
2×AmpliTaq Gold PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
2-Mercaptoethanol	Nacalai Tesque
2-Propanol	Nacalai Tesque
2.0 mol/L Sodium Hydroxide Solution	Nacalai Tesque
2.5 mM dNTP	TaKaRa
293FT Cell Line	Thermo Fisher Scientific
3.0 mol/L Sodium Acetate Buffer Solution (pH 5.2)	Nacalai Tesque
50×modified Tris Acetate EDTA (TAE) buffer	Millipore
6×Loading Buffer Orange G	Nippon Gene
Acetonitrile	Sigma-Aldrich
Agarose	Nacalai Tesque
Antibiotic Antimycotic Mixed Stock Solution	Nacalai Tesque
Anti-Human CYP2B6 antibody	Abcam
Bacto Tryptone	Corning
Bacto Yeast Extract	Corning
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Blocking One	Nacalai Tesque
$\beta$ -Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate ( $\beta$ -NADP <sup>+</sup> )	Oriental Yeast
Calnexin, pAb	Enzo Life Sciences

CYP2B6 bacuosomes	Thermo Fisher Scientific
D-Glucose-6-phosphate, disodium salt (G-6-P)	Oriental Yeast
Dimanganese decarbonyl	Sigma-Aldrich
Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM)	Nacalai Tesque
e-PAGEL 10%	ATTO
Ethidium bromide (EtBr)	Nacalai Tesque
di-sodium Dihydrogen Ethylenediamine	
-tetraacetate Dihydrate (EDTA)	Nacalai Tesque
FastGene Gel/PCR Extraction Kit	Nippon Genetics
Fast Media Amp Agar	InvivoGen
Fast Media Amp TB	InvivoGen
Fast Media Kan Agar	InvivoGen
Fast Media Kan TB	InvivoGen
Fetal bovine serum (FBS)	Biowest
Formic Acid (abt. 99%)	Wako
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH)	Oriental Yeast
Glycerol	Nacalai Tesque
Glycine	Nacalai Tesque
Goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2054	Santa Cruz Biotechnology
MagicMark XP Western Protein Standard	Thermo Fisher Scientific
Magnesium chloride hexahydrate ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Nacalai Tesque
Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific
NucleoBond Xtra Maxi EF	Macherey-Nagel
One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific

Opti-MEM I Reduced-serum Medium	Thermo Fisher Scientific
pENTR/D-TOPO Cloning Kit	Thermo Fisher scientific
pcDNA3.4-TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Life Technologies
Phosphate-buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	Nacalai Tesque
Potassium Chloride (KCl)	Nacalai Tesque
Potassium Dihydrogenphosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Nacalai Tesque
Potassium Hydroxide (KOH)	Nacalai Tesque
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific
Sodium Chloride (NaCl)	Nacalai Tesque
Sodium Cholate hydrate	Sigma-Aldrich
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Nacalai Tesque
Sodium Hydrosulfite	Nacalai Tesque
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific
Trans-Blot Turbo Transfer Pack	Bio-Rad
TransFectin Lipid Reagent	Bio-Rad
Tris Buffered Saline (10×) (pH 7.4)	Nacalai Tesque
Tris-EDTA buffer (TE)	Promega
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Nacalai Tesque
Trypsin	Nacalai Tesque
XL10-Gold Ultracompetent Cells	Agilent Technologies

その他の試薬類は、すべて市販特級品を使用した。



また、PCR プライマーは株式会社ファスマックに合成を依頼した。精製グレードは逆相カラム精製とした。

## 7. 使用機器・カラム

DNA 増幅装置: T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)

アガロースゲル電気泳動装置: Mupid-2plus (Mupid)

アガロースゲル撮影装置: WSE-5200 プリントグラフ 2M (ATTO)

吸光度測定器: Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific) 及び

Cary 300 UV-Vis Spectrophotometer (Agilent technologies)

超音波ホモジナイザー: ULTRASONIC HOMOGENIZER Smurt NR-50M

(マイクロテック・ニチオン)

吸光度解析用ソフトウェア: JASCO スペクトルマネージャ (日本分光)

SDS-PAGE 電気泳動槽: ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO)

ウェスタンブロット転写装置: Trans Blot Turbo (Bio-Rad)

パワーサプライ: Electrophoresis Power Supply EPS 301 (GE Healthcare)

化学発光検出装置: ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad)

LED ライト: スポットエース SPA-10SW (HAYASHI WATCH-WORKS)

遠心濃縮装置 (エタノール沈殿用): MicroVac (TOMY)

LC-MS/MS 分離装置: NANOSPACE SI-2 (OSAKA SODA)

LC-MS/MS 検出器: TSQ Quantiva Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific)

LC-MS/MS 分離カラム: Luna C18 100A column (2 × 150 mm, 5.0-μm; Phenomenex)

LC-MS/MS データ解析ソフトウェア: Xcalibur (Thermo Fisher Scientific)

遺伝情報処理ソフト: GENETYX 13 (GENETYX)

HPLC 分析装置: Nexera series system (SHIMADZU)

HPLC-蛍光検出器: RF10AXL fluorescence detector (SHIMADZU)

HPLC カラム: YMC-Pack ODS-AQ column (4.6 × 150 mm, 5-μm; YMC)

HPLC データ解析ソフトウェア: LabSolutions (SHIMAZU)

酵素反応速度論的解析用ソフト: SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc)

統計解析ソフト: IBM SPSS Statistics Ver. 22.0 (IBM)

3D モデリングソフト: Discovery Studio 2016 (BIOVIA)

## 8. プライマー配列

### 8-1. pENTR vector シークエンス用プライマー

M13F30: 5'-AGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTC-3'

M13R30: 5'-AATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATG-3'

### 8-2. *CYP2B6* 遺伝子多型シークエンス用プライマー

CYP2B6\_Seq\_F1: 5'-CTCAGTGTCTGATAGAGGAGAGCTTCGGA-3'

CYP2B6\_Seq\_F2: 5'-TCAGAGATTTTCCGACCTTCTCCCCA-3'

CYP2B6\_Seq\_R1: 5'-AAACAGCTGGCCGAATACAGAGC-3'

CYP2B6\_Seq\_F2: 5'-AGAGCAGTGCTCAGGATGAGAA-3'

### 8-3. 哺乳類細胞発現用ベクター挿入確認用プライマー

CYP2B6\_Seq\_F2: 5'-TCAGAGATTTTCCGACCTTCTCCCCA-3'

2B6\_ConR: 5'-TCTACTCCACACAGCATGACCACG-3'

## 実験方法

### 1. *CYP2B6* レアバリエーションのシーケンス

PCR 増幅ならびにシーケンス解析は Hishinuma ら及び Nagasaki らの報告を参考にした[56, 102]。同定された新規遺伝子多型について、被検者の末梢血白血球 DNA 検体を鋳型として PCR 増幅を行った。2×AmpliTaq Gold 360 Master Mix を 10  $\mu$ L、10  $\mu$ M のフォワード及びリバースプライマー (Table 3) を各 1  $\mu$ L 及び鋳型 DNA を 1  $\mu$ L 添加し、滅菌精製水を加え全量を 20  $\mu$ L とした。反応温度条件は、95°C で 10 分間の処理後、95°C で 30 秒、60°C で 30 秒、72°C で 1 分の反応を 30 サイクル行い、72°C で 7 分間処理した。得られた PCR 産物を FastGene Gel/PCR Extraction Kit にて精製し、シーケンス解析を ToMMo にて行った。シーケンスプライマーは PCR に使用したプライマーセットと同じものを使用した。

### 2. ヒト *CYP2B6* cDNA のクローニング

#### 2-1. PCR による *CYP2B6* cDNA の増幅

GenBank の NM\_000767 のリファレンス配列を基に合成した野生型 *CYP2B6* cDNA を鋳型 DNA として PCR 増幅を行った。10×PfuUltra HF reaction buffer を 2.0  $\mu$ L、10  $\mu$ M の *CYP2B6* クローニングフォワードプライマー及びリバースプライマー (Table 3) を各 1.0  $\mu$ L、2.5 mM の dNTP を 1.6  $\mu$ L、PfuUltra HF DNA polymerase を 0.5  $\mu$ L、鋳型 DNA を 2 pg 混合し、滅菌精製水で全量 20  $\mu$ L となるように反応液を調製した。反応温度条件は、95°C で 2 分間処理した後、95°C で 30 秒間、68°C で 90 秒間のサイクルを 30 サイクル繰り返し、72°C で 10 分間処理した。PCR 産物の確認は、EtBr を含む 1.0% アガロースゲルを用いて 100 V で 30 分間の電気泳動後、UV 照射によって行った。

#### 2-2. PCR 産物の精製

PCR 産物は FastGene Gel/PCR Extraction Kit を使用して、添付のマニュアルに従い精製を行った。  
なお、カラムからの溶出には GP3 Elution Buffer 20  $\mu$ L を使用し、精製 PCR 産物を回収した。

### 2-3. PCR 産物のライゲーション及びトランスフォーメーション

クローニングベクター (pENTR/D-TOPO) 0.5  $\mu$ L を用い、精製した PCR 産物 2.0  $\mu$ L 及び Salt solution を 0.5  $\mu$ L 加え、室温で 5 分間インキュベートし、ライゲーションを行った。次に、その反応液 1.0  $\mu$ L をコンピテントセル (XL10-Gold) 18  $\mu$ L に加え、30 分間氷上で静置し、42°C で 30 秒間の加熱処理によりトランスフォーメーションを行った。これに S.O.C. Medium を 125  $\mu$ L 添加後、37°C で 1 時間、200 rpm で振とう培養した。その後、培養液を 100  $\mu$ L、カナマイシン含有 LB 寒天プレートにスプレッドし、37°C で 16 時間培養した。

### 2-4. 液体培養及びプラスミド精製及びシーケンス解析

単一のコロニーを選択し、カナマイシン含有液体培地 2.0 mL に移植し、37°C で 16 時間、250 rpm で振とう培養した。プラスミドの精製には QIAprep Spin Miniprep Kit を使用し、添付のマニュアルに従い精製を行った。精製したプラスミドのシーケンス解析は、株式会社ファスマックに委託した。シーケンスプライマーとして、CYP2B6\_Seq (実験材料 8-2. プライマー配列) を用いた。シーケンス解析により、エラーのないことが確認された野生型プラスミドをエントリークローンとした。

## 3. CYP2B6 バリエーションエントリークローンの作製

### 3-1. SDM 法による塩基多型の導入

SDM 法には、QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit を用いた。鋳型 CYP2B6 エントリークローン (5.0 ng/ $\mu$ L) を 2.0  $\mu$ L、10×QuikChange Lightning Buffer を 2.0  $\mu$ L、50 ng/ $\mu$ L フォワードプライマー及びリバープライマー (Table 4) を各 1.0  $\mu$ L、QuikChange XL dNTP mix を 0.4  $\mu$ L、

QuikSolution reagent を 0.6  $\mu\text{L}$ 、QuikChange Lightning Enzyme を 0.4  $\mu\text{L}$  混合して、滅菌精製水で全量 20.4  $\mu\text{L}$  となるように反応液を調製した。反応温度条件は、95°C で 2 分間処理した後、95°C で 20 秒間、60°C で 10 秒間、68°C で 2 分 15 秒間のサイクルを 18 サイクル繰り返し、68°C で 5 分間処理した。得られた PCR 産物の確認は、EtBr を含む 1.0% アガロースゲルを用いて 100 V で 30 分間の電気泳動後、UV 照射によって行った。

### 3-2. *DpnI* を用いた制限酵素処理

特異的増幅が確認された PCR 産物に対し、鋳型 DNA を消化するため *DpnI* を用いた制限酵素処理を行った。処理は PCR 産物に制限酵素 *DpnI* を 0.8  $\mu\text{L}$  加えて、37°C で 5 分間行った。

### 3-3. 塩基多型導入 *CYP2B6* エントリークローンのトランスフォーメーション

コンピテントセル (XL10-Gold) 18  $\mu\text{L}$  に XL10-Gold  $\beta$ -Mercaptoethanol mix を 0.8  $\mu\text{L}$  加えて 2 分間氷上でインキュベートし、制限酵素処理後の PCR 産物を 0.5  $\mu\text{L}$  加え、30 分間氷上に静置した。その後 42°C で 30 秒間の加熱処理によりトランスフォーメーションを行い、37°C で 1 時間、200 rpm で振とう培養した。培養液を 20  $\mu\text{L}$ 、カナマイシン含有 LB 寒天プレートにスプレッドし、37°C で 16 時間培養した。

### 3-4. 塩基多型導入 *CYP2B6* 発現エントリークローンのシーケンス解析による確認

前述 (2-4) と同様の方法で液体培養及びプラスミド精製及びシーケンス解析を行った。シーケンスプライマーとして、*CYP2B6*\_Seq (実験材料 8-2. プライマー配列) を用い、全領域の塩基配列の確認を行った。シーケンス解析により、塩基多型の導入とエラーのないことが確認されたバリエントプラスミドをエントリークローンとした。

## 4. 哺乳類細胞発現用ベクターへの *CYP2B6* の挿入

#### 4-1. LR 組み換え反応

野生型及びバリエント *CYP2B6* エントリークローン 75 ng と当研究室で作製した Gateway system 化した pcDNA3.4 75 ng を混合して、TE Buffer (pH 8.0) にて全量 4.0  $\mu$ L となるように反応液を調製した。これに Gateway LR Clonase II Enzyme Mix を 1.0  $\mu$ L 加え、25°C で 1 時間インキュベートした。その後 Proteinase K Solution を 0.5  $\mu$ L 加え、37°C で 10 分間インキュベートした。

#### 4-2. *CYP2B6* cDNA 挿入 pcDNA3.4 のトランスフォーメーション

コンピテントセル (TOP10) 25  $\mu$ L に *CYP2B6* cDNA 挿入 pcDNA3.4 を 0.5  $\mu$ L 加えて 30 分間氷上で静置後、42°C で 30 秒間処理することによりトランスフォーメーションを行った。これに S.O.C. Medium を 125  $\mu$ L 添加して、37°C で 1 時間、200 rpm で振とう培養した。その後、培養液 20  $\mu$ L をアンピシリン含有 LB 寒天プレートにスプレッドし、37°C で 16 時間培養した。

#### 4-3. 液体培養及びプラスミド精製、シーケンス解析

得られたコロニーより、単一のコロニーを選択してアンピシリン含有液体培地 2.0 mL に移植し、37°C で 16 時間、250 rpm で振とう培養した。プラスミド精製には QIAprep Spin Miniprep Kit を使用し、添付のマニュアルに従い精製を行った。シーケンス解析は、前述 (1-4) と同様の方法で行った。シーケンスプライマーとして、*CYP2B6*\_Seq\_F2 及び 2B6\_ConR (実験材料 8-3. プライマー配列) を用い、LR 組み換え反応による Gateway system 化 pcDNA3.4 ベクターへの挿入及び鋳型としたエントリークローンのコンタミネーションを確認した。シーケンス解析により挿入が確認され、コンタミネーションのなかったプラスミドを発現クローンとした。

### 5. 野生型及びバリエント *CYP2B6* 発現プラスミドの大量回収

#### 5-1. 野生型及びバリエント *CYP2B6* 発現プラスミドの精製

野生型及びバリエント *CYP2B6* 発現プラスミドを導入した大腸菌のグリセロールストックをア

ンピシリン含有液体培地 500  $\mu$ L に移植した。次いで、アンピシリン含有 LB 寒天培地に 100  $\mu$ L スプレッドし、37°C で 16 時間培養した。得られたコロニーより、単一のコロニーを選択してアンピシリン含有液体培地 2.0 mL に移植し、37°C で 8 時間、250 rpm で振とう培養した。その後、培養液をアンピシリン含有液体培地 100 mL に添加し、37°C で 16 時間、250 rpm で振とう培養した。プラスミドの精製には NucleoBond Xtra Maxi EF を使用し、添付のマニュアルに従って精製した。

## 5-2. エタノール沈殿

250  $\mu$ L のプラスミド DNA に 25.0  $\mu$ L の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液、99.5% エタノール 625  $\mu$ L を添加し、十分に混和して、室温で 2 分間インキュベートした後、18,000 $\times$ g、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を除去した後、70%エタノール 1 mL を添加し、18,000 $\times$ g、4°C で 2 分間遠心分離した。同様の操作を再度行い、上清を除去した後、ペレットを真空中で約 10 分間乾燥させ、滅菌精製水 250  $\mu$ L に溶解した。

## 6. CYP2B6 のヒト胎児腎臓由来細胞 (293FT 細胞) 発現系の構築

### 6-1. 293FT 細胞の前培養

100 mm のシャーレ (10 mL の培地) に対して  $2.0 \times 10^6$  個の 293FT 細胞を添加し、5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で 24 時間インキュベートした。培地は抗生物質・抗真菌剤含有及び 10% FBS 含有の Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM) を用いた。

### 6-2. 発現プラスミドの 293FT 細胞へのトランスフェクション

CYP2B6 発現プラスミド 5  $\mu$ g 及び TransFectin Lipid Reagent 15  $\mu$ L をそれぞれ Opti-MEM I Reduced-serum Medium と混合し、全量を 1.5 mL に調製した。次にこれらの溶液を混合し、室温で 20 分間インキュベートした。前述 (6-1) の 100 mm のシャーレの液体培地中に添加後、穏やかに振とうし、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 37°C で 24 時間培養した。

### 6-3. 293FT 細胞の回収及びミクロソーム画分の調製

100 mm のシャーレの培地を取り除き、滅菌済みの Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後、予冷したソニケーションバッファー (10 mM Tris-HCl、pH 7.4、1 mM EDTA、10% Glycerol) 約 3.0 mL で細胞を遠沈管に回収した。1,500 rpm、室温で 5 分間遠心分離をし、その上清を取り除いた。再度ソニケーションバッファー 1.0 mL で懸濁後、ソニケーション (1 秒パルスを 60 回) により細胞を破壊した。9,000×g、4°C で 20 分間遠心分離を行い、上清を 105,000×g、4°C で 1 時間遠心分離した。得られた残渣をホモジナイザーにてホモジナイズバッファー (50 mM Tris-HCl、pH 7.4、1 mM EDTA、150 mM KCl、20% Glycerol、Protease Inhibitor Cocktail) 150 µL に懸濁し、これをミクロソーム画分とした。タンパク質の定量は BCA Protein Assay Kit を用いて行った。スタンダードには、0.25–1.5 mg/mL となるように調製した bovine serum albumin を用いた。

## 7. ウェスタンブロット法による発現タンパク質の確認

### 7-1. SDS-PAGE

発現タンパク質 5.0 µg と 2×Sample buffer (500 mM Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、12% 2-Mercaptoethanol、20% Glycerol、Pyronin Y 適量) を等量混合し、100°C で 5 分間熱変性処理した後、ゲルにアプライした。ゲルは 10% ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL) を用いて、20 mA で 1 時間 20 分間電気泳動した。泳動用緩衝液には SDS buffer を用いた。なお、SDS buffer は Tris 1.5 g、グリシン 7.2 g 及び SDS 0.5 g を精製水に溶かし、全量を 500 mL とした。

### 7-2. ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは Trans-Blot Turbo Transfer Pack を使用し、添付のマニュアルに従って行った。その後 PVDF 膜を 0.05% Tween 20 を含む TBS (pH 7.4) で表裏 5 分間ずつ振とうした後、Blocking One を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。



### 7-3. 1 次抗体反応

5% Blocking One-TBS 5.0 mL に Anti-CYP2B6 抗体 5.0  $\mu$ L を混合し、各 CYP2B6 バリエーション酵素を検出するための 1 次抗体液とした。また、5% Blocking One-TBS 5.0 mL にカルネキシン抗体 1.0  $\mu$ L を混合し、カルネキシンを検出するための 1 次抗体液とした。50 mL 遠沈管に 1 次抗体液を添加後、PVDF 膜を入れて密閉し、室温で 1 時間回転混和した。抗体反応終了後は、0.05% Tween 20 を含む TBS (pH 7.4) を用いて室温で 5 分間の洗浄を 3 回行った。

### 7-4. 2 次抗体反応

5% Blocking One-TBS 5.0 mL に Horseradish peroxidase 標識した Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins を 1.0  $\mu$ L または 0.5  $\mu$ L 混合し、それぞれ CYP2B6、カルネキシンを検出する 2 次抗体液とした。抗体反応終了後は、0.05% Tween 20 を含む TBS (pH 7.4) を用いて室温で 5 分間の洗浄を 3 回行った。

### 7-5. 発光反応

SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate を用いて発光反応を行った。キット中の SuperSignal West Dura Luminol/Enhancer Solution 及び SuperSignal West Dura Stable Peroxide Buffer を等量混合し、反応液とした。PVDF 膜に反応液を添加し、室温で 5 分間インキュベートした後、化学発光の発光強度を ChemiDoc XRS+ で測定した。

## 8. CO 差スペクトルの測定

ホロ P450 の定量は Omura & Sato ら及び Guengerich らの P450 含量の測定法を参考に、一部改変したプロトコルにより行った[103, 104]。吸光度の測定は Cary 300 UV-Vis Spectrophotometer を用いて行った。ミクロソーム画分(0.80  $\pm$  0.20 mg of microsomal proteins) 40  $\mu$ L と CO 差スペクトル測定用バッファー (0.1 M リン酸カリウム緩衝液 pH 7.4、20% Glycerol) 160  $\mu$ L を混合し、試料用セル

と対照用セルに 95  $\mu\text{L}$  ずつ入れ、400–500 nm のベースラインを測定した。Kaneko & Suzuki らを参考にして[105]、試料用セルに 20 mM Dimanganese decacarbonyl、対照用セルに Dimethyl sulfoxide をそれぞれ 1.0  $\mu\text{L}$  ずつ添加し混合した。試料用セルに LED 光を室温で 30 秒間照射した。試料用セル及び対照用セルに還元剤である 500 mM Sodium hydrosulfite を 5.0  $\mu\text{L}$  添加し、400–500 nm における吸光度を測定した。ホロ P450 の定量は JASCO スペクトルマネージャを用いた。450 nm 付近の吸収極大点と 490 nm 付近の吸光度差を求め、ミリモル吸光係数  $\epsilon = 91$  を用いて P450 含量を求めた。なお、値は測定 3 回分の平均値  $\pm$  標準偏差として表した。

## 9. 発現 CYP2B6 の EFZ 8 位水酸化活性測定

### 9-1. 検量線の調製

メタノールにより溶解した 40mM 8-HEFZ をメタノールで濃度が 1500、750、375、150、75、37.5、15、7.5、3.75、1.5、0.75、0.375、及び 0.15  $\mu\text{M}$  となるように順次希釈した。3.3 mM  $\text{MgCl}_2$ 、NADPH 生成系からなる反応液に終濃度が 1.0 nM–10  $\mu\text{M}$  となるように 8-HEFZ 希釈系を加え、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) で全量を 150  $\mu\text{L}$  とした。次に、内標準物質として 2  $\mu\text{M}$  8-HEFZ-d4 体 (終濃度 1  $\mu\text{M}$ ) を含有したアセトニトリル 150  $\mu\text{L}$  を加え、その溶液 10  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS で分析する検量線用試薬とした。なお NADPH 生成系は、G-6-P、 $\beta$ -NADP<sup>+</sup>、G-6-PDH を 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) で、それぞれ終濃度 3.3 mM、1.3 mM、0.4 U/mL に調整したものを等量ずつ混合し使用した。

### 9-2. サンプルの調製

メタノールにより溶解した 100 mM EFZ をメタノールで濃度が 30、15、7.5、3.75、1.5、0.75、0.375、0.15 mM となるように順次希釈した。各発現タンパク質のミクロソーム画分 50.0  $\mu\text{g}$  と終濃度 3.3 mM  $\text{MgCl}_2$  からなる反応液に EFZ 希釈系 (終濃度 1–200  $\mu\text{M}$ ) を加え、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) にて全量を 135  $\mu\text{L}$  とした。反応は、NADPH 生成系 15  $\mu\text{L}$  添加で開始し、37°C

で 30 分間インキュベートした。なお、Blank には終濃度 200  $\mu\text{M}$  EFZ を用い、NADPH 生成系の代わりに 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) を加えた。その後、内標準物質として 2  $\mu\text{M}$  8-HEFZ-d4 体 (終濃度 1  $\mu\text{M}$ ) を含有したアセトニトリル 150  $\mu\text{L}$  を添加し、反応を停止した。氷上で 5 分間放置後、14,000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間遠心分離し、除タンパク質後、LC-MS/MS 用分析試料とした。

### 9-3. LC-MS/MS 解析

測定は Ward ら及び Desta らの報告を参考に実験を行った[57, 58]。EFZ が各発現 CYP2B6 バリエーションにより代謝されて生成した 8-HEFZ を LC-MS/MS で分析した。移動相として水 (0.1%ギ酸): アセトニトリル (0.1%ギ酸) を使用し、0–3 分は精製水 (0.1% ギ酸): アセトニトリル (0.1% ギ酸) = 100: 0, v/v、3–4 分は精製水 (0.1% ギ酸): アセトニトリル (0.1% ギ酸) = 50: 50, v/v、4–6 分は精製水 (0.1% ギ酸): アセトニトリル (0.1% ギ酸) = 10: 90, v/v、6–8 分は精製水 (0.1% ギ酸): アセトニトリル (0.1% ギ酸) = 0: 100, v/v への直線グラジエント、8–12 分は精製水 (0.1% ギ酸): アセトニトリル (0.1% ギ酸) = 0: 100, v/v を維持、12–12.1 分は精製水 (0.1% ギ酸): アセトニトリル (0.1% ギ酸) = 100: 0, v/v への直線グラジエント、12.1–15 分は精製水 (0.1% ギ酸): アセトニトリル (0.1% ギ酸) = 100: 0, v/v として流速 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  で分離した。MS での検出は electro-spray ionization 法を用いてイオン化を行い、negative ion mode にて検出した。イオンは multiple reactions monitoring モードにより EFZ、8-HEFZ 及び 8-HEFZ-d4 に観測された強度の最も大きいイオンを検出、定量を行なった。EFZ、8-HEFZ 及び 8-HEFZ-d4 体の際に用いた precursor-product ion は、EFZ は  $m/z \rightarrow 244.1$ 、8-HEFZ は  $m/z \rightarrow 258.1$ 、8-HEFZ-d4 体は  $m/z \rightarrow 258.1$  のものを使用した。

### 9-4. 酵素反応速度論的パラメータの算出

キネティックデータを酵素反応速度論的解析用ソフト SigmaPlot 12.5 の Enzyme Kinetics Module に導入し、Nonlinear regression analysis により  $K_m$ 、 $V_{\max}$  及び  $CL_{\text{int}}$  ( $V_{\max}/K_m$ ) を算出した。値は反応

3 回分の平均値  $\pm$  標準偏差として表した。

## 10. 発現 CYP2B6 の 7-ETC *O*-脱エチル化活性に対する測定

### 10-1. 検量線の調製

DMSO により溶解した 150 mM 7-HTC をメタノールで濃度が 150、75、30、15、7.5、3.0、1.5 及び 0.75  $\mu$ M となるように順次希釈した。3.3 mM  $\text{MgCl}_2$ 、NADPH 生成系からなる反応液に終濃度が 0.005–0.1  $\mu$ M となるように 7-HTC 希釈系を加え、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) で全量を 150  $\mu$ L とした。次に、アセトニトリル 150  $\mu$ L を加え HPLC で分析する検量線用試薬とした。なお NADPH 生成系は、G-6-P、 $\beta$ -NADP<sup>+</sup>、G-6-PDH を 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) で、それぞれ終濃度 3.3 mM、1.3 mM、0.4 U/mL に調整したものを等量ずつ混合し使用した。

### 10-2. サンプルの調製

DMSO により溶解した 30 mM 7-ETC をメタノールで濃度が 7.5、4.5、3.0、1.8、0.75、0.375、0.225 及び 0.15 mM となるように順次希釈した。各発現タンパク質のミクロソーム画分 30.0  $\mu$ g、終濃度 3.3 mM  $\text{MgCl}_2$  からなる反応液に 7-ETC 希釈系 (終濃度 1–50  $\mu$ M) を加え、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) にて全量を 135  $\mu$ L とした。反応は、NADPH 生成系添加で開始し、37°C で 20 分間インキュベートした。なお、Blank には 7.5 mM 7-ETC を用い、NADPH 生成系の代わりに 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) を加えた。その後、アセトニトリル 150  $\mu$ L を添加し、反応を停止した。10,000 $\times$ g、4°C で 3 分間遠心分離し、除タンパク質後、HPLC 分析試料とした。

### 10-3. HPLC 解析

測定は Morse らの報告を参考に実験を行った[106]。7-ETC が各発現 CYP2B6 により代謝されて生成した 7-HTC を HPLC で分析した。移動相として 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) / メタノール (40 : 60) を用い、流速 1.0 mL/min で分離し、検出は励起波長 410 nm、測定波長 510 nm

の蛍光検出で行った。なお、カラムには YMC-Pack ODS-AQ/S-5  $\mu\text{m}/12\text{ nm}$  ( $150\times 4.6\text{mm.I.D.}$ ) を用い、カラム温度は  $40^{\circ}\text{C}$ 、サンプル温度を  $10^{\circ}\text{C}$  とし、サンプル注入量を  $50.0\text{ }\mu\text{L}$  とした。クロマトグラフ上のピークはデータ解析ソフトにより得られた面積より算出し、絶対検量線法により解析した。7-HTC の保持時間は 3.4 分であった。

#### 10-4. 酵素反応速度論的パラメータの算出

キネティックデータを酵素反応速度論的解析用ソフト SigmaPlot 12.5 の Enzyme Kinetics Module に導入し、nonlinear regression analysis により  $K_m$ 、 $V_{\max}$  及び  $CL_{\text{int}}$  ( $V_{\max}/K_m$ ) を算出した。値は反応 3 回分の平均値  $\pm$  標準偏差として表した。

#### 11. X 線回折結晶構造による解析

3D ドッキングシミュレーションモデリングソフトを用い、各 CYP2B6 バリエント酵素の活性変化に対する考察を行った。解析ソフトモデルは Discovery Studio 2.5 の CDocker プロトコルに従いモデリングを行った。構造は Protein Data Bank の 3IBD を用い、2 つのアミノ酸置換 (Tyr226His 及び Lys262Arg) が含まれているため、野生型 CYP2B6 のアミノ酸に再置換を行った。その後、野生型 CYP2B6 に EFZ をドッキングさせ、塩基置換導入後、構造最適化を行った。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野教授 平澤典保先生ならびに御校閲賜りました同がん化学療法薬学分野教授 富岡佳久先生、同薬理学分野講師 森口茂樹先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始懇切丁寧な御指導、御鞭撻ならびに御教授を頂きました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野准教授 平塚真弘先生に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始温かい御指導、御助言を頂きました同分野助手 瀬川良佑先生、同分野元准教授 守屋孝洋先生ならびに同分野元助教 水野夏実先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、日本人集団における遺伝子多型データ解析に御尽力頂きました東北大学・東北メディカル・メガバンク機構長 山本雅之先生、同ゲノム解析部門教授 長崎正朗先生、同バイオバンク部門教授 峯岸直子先生、同ゲノム解析部門客員教授 安田純先生ならびに同ゲノム解析部門講師 齋藤さかえ先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、三次元構造モデリングについて御指導くださいました名城大学薬学部生物物理化学研究室教授 小田彰史先生に深く感謝致します。

本研究における LC-MS/MS を用いた測定において、多大なる御協力を賜りました東北大学・東北メディカル・メガバンク機構ゲノム解析部門講師 三枝大輔先生に厚く御礼申し上げます。また、HPLC-蛍光検出器を用いた測定において、御指導くださいました東北大学病院薬剤部教授・薬剤部長 眞野成康先生、同薬剤部准教授・副薬剤部長 山口浩明先生、同薬剤部助教 前川正充先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、終始御親切な御助言及び御協力をいただきました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野修了生 齋藤雄大博士、菱沼英史博士に深謝の意を表します。また、多くの有益なる御助言を頂きました同分野博士課程三年 Evelyn Marie Gutiérrez Rico 氏、同分野博士課程二年 公文代将希氏、同分野六年 伊藤暁生氏、中西悠悦氏、同分野五年 成田瑤子氏ならびに同分野四年 斉藤悠氏をはじめとする生活習慣病治療薬学分野の皆様深く感謝致します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始温かい御支援を頂きました東北労災病院病院長 徳村弘実先生、同薬剤部長 菅野和彦先生、同薬剤副部長 大月沢雄先生、大館市立総合病院薬剤部長 中居肇先生ならびに中部労災病院薬剤部長 伊藤功治先生に謹んで感謝の意を申し上げます。

最後に、3年間支え見守ってくださった家族、東北労災病院の皆様に甚謝の意を申し上げます。

## 参考文献

- [1] W.E. Evans, M.V. Relling, Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics, *Science* 286 (1999) 487-91.
- [2] U.A. Meyer, Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity, *Nature reviews Genetics* 5 (2004) 669-76.
- [3] U.A. Meyer, Pharmacogenetics and adverse drug reactions, *Lancet* 356 (2000) 1667-71.
- [4] Y. Momose, M. Murata, K. Kobayashi, M. Tachikawa, Y. Nakabayashi, I. Kanazawa, T. Toda, Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms, *Annals of neurology* 51 (2002) 133-6.
- [5] D.B. Goldstein, S.K. Tate, S.M. Sisodiya, Pharmacogenetics goes genomic, *Nature reviews Genetics* 4 (2003) 937-47.
- [6] W. Manuyakorn, K. Siripool, W. Kamchaisatian, S. Pakakasama, A. Visudtibhan, S. Vilaiyuk, T. Rujirawat, S. Benjaponpitak, Phenobarbital-induced severe cutaneous adverse drug reactions are associated with CYP2C19\*2 in Thai children, *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 24 (2013) 299-303.
- [7] N.J. Jalil, Z. Bannur, A. Derahman, O. Maskon, N. Darinah, H. Hamidi, O.A. Gunasekaran, M. Rafizi, N.I. Azreen, T.L. Kek, M.Z. Salleh, The Implication of the Polymorphisms of COX-1, UGT1A6, and CYP2C9 among Cardiovascular Disease (CVD) Patients Treated with Aspirin, *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 18 (2015) 474-83.
- [8] M. Hiratsuka, H. Yamashita, F. Akai, H. Hosono, E. Hishinuma, N. Hirasawa, T. Mori, Genetic polymorphisms of dihydropyrimidinase in a Japanese patient with capecitabine-induced toxicity, *PloS one* 10 (2015) e0124818.
- [9] N. Bozina, V. Bradamante, M. Lovric, Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a



susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 60 (2009) 217-42.

[10] T. Hirota, S. Eguchi, I. Ieiri, Impact of genetic polymorphisms in CYP2C9 and CYP2C19 on the pharmacokinetics of clinically used drugs, *Drug metabolism and pharmacokinetics* 28 (2013) 28-37.

[11] U.M. Zanger, M. Schwab, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacology & therapeutics* 138 (2013) 103-41.

[12] D.R. Nelson, Cytochrome P450 nomenclature, 2004, *Methods in molecular biology* 320 (2006) 1-10.

[13] B. Meunier, S.P. de Visser, S. Shaik, Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes, *Chemical reviews* 104 (2004) 3947-80.

[14] G.R. Wilkinson, Drug metabolism and variability among patients in drug response, *The New England journal of medicine* 352 (2005) 2211-21.

[15] F.P. Guengerich, Cytochrome p450 and chemical toxicology, *Chemical research in toxicology* 21 (2008) 70-83.

[16] U.M. Zanger, M. Turpeinen, K. Klein, M. Schwab, Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation, *Analytical and bioanalytical chemistry* 392 (2008) 1093-108.

[17] S. Rendic, Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data, *Drug metabolism reviews* 34 (2002) 83-448.

[18] U.M. Zanger, K. Klein, T. Saussele, J. Blievernicht, M.H. Hofmann, M. Schwab, Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance, *Pharmacogenomics* 8 (2007) 743-59.

[19] E. Hodgson, R.L. Rose, The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals, *Pharmacology & therapeutics* 113 (2007) 420-8.

[20] H. Kawakami, S. Ohtsuki, J. Kamiie, T. Suzuki, T. Abe, T. Terasaki, Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography

tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection, *Journal of pharmaceutical sciences* 100 (2011) 341-52.

[21] M. Turpeinen, U.M. Zanger, Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance, *Drug Metabolism and Drug Interactions* 27 (2012) 185-97.

[22] S. Ohtsuki, O. Schaefer, H. Kawakami, T. Inoue, S. Liehner, A. Saito, N. Ishiguro, W. Kishimoto, E. Ludwig-Schwellinger, T. Ebner, T. Terasaki, Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 40 (2012) 83-92.

[23] S.M. Hoffman, D.R. Nelson, D.S. Keeney, Organization, structure and evolution of the CYP2 gene cluster on human chromosome 19, *Pharmacogenetics* 11 (2001) 687-98.

[24] L. Gervot, B. Rochat, J.C. Gautier, F. Bohnenstengel, H. Kroemer, V. de Berardinis, H. Martin, P. Beaune, I. de Waziers, Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities, *Pharmacogenetics* 9 (1999) 295-306.

[25] H. Wang, L.M. Tompkins, CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme, *Current drug metabolism* 9 (2008) 598-610.

[26] U.M. Zanger, K. Klein, Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance, *Frontiers in Genetics* 4 (2013) 24.

[27] K. Tsuchiya, H. Gatanaga, N. Tachikawa, K. Teruya, Y. Kikuchi, M. Yoshino, T. Kuwahara, T. Shirasaka, S. Kimura, S. Oka, Homozygous CYP2B6\*6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319 (2004) 1322-6.

[28] J. King, J.A. Aberg, Clinical impact of patient population differences and genomic variation in efavirenz therapy, *AIDS* 22 (2008) 1709-17.

[29] R. Lubomirov, S. Colombo, J. di Iulio, B. Ledergerber, R. Martinez, M. Cavassini, B. Hirschel, E.

Bernasconi, L. Elzi, P. Vernazza, H. Furrer, H.F. Gunthard, A. Telenti, Association of pharmacogenetic markers with premature discontinuation of first-line anti-HIV therapy: an observational cohort study, *The Journal of infectious diseases* 203 (2011) 246-57.

[30] A. Sanchez Martin, S. Cabrera Figueroa, R. Cruz Guerrero, L.P. Hurtado, A.D. Hurle, A. Carracedo Alvarez, Impact of pharmacogenetics on CNS side effects related to efavirenz, *Pharmacogenomics* 14 (2013) 1167-78.

[31] T.T. Vo, S. Varghese Gupta, Role of cytochrome P450 2B6 pharmacogenomics in determining efavirenz-mediated central nervous system toxicity, treatment outcomes, and dosage adjustments in patients with human immunodeficiency virus infection, *Pharmacotherapy* 36 (2016) 1245-1254.

[32] H. Gatanaga, T. Hayashida, K. Tsuchiya, M. Yoshino, T. Kuwahara, H. Tsukada, K. Fujimoto, I. Sato, M. Ueda, M. Horiba, M. Hamaguchi, M. Yamamoto, N. Takata, A. Kimura, T. Koike, F. Gejyo, S. Matsushita, T. Shirasaka, S. Kimura, S. Oka, Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45 (2007) 1230-7.

[33] H. Gatanaga, S. Oka, Successful genotype-tailored treatment with small-dose efavirenz, *AIDS* 23 (2009) 433-4.

[34] N.Y. Rakhmanina, J.N. van den Anker, Efavirenz in the therapy of HIV infection, *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 6 (2010) 95-103.

[35] O. Levran, E. Peles, S. Hamon, M. Randesi, M. Adelson, M.J. Kreek, CYP2B6 SNPs are associated with methadone dose required for effective treatment of opioid addiction, *Addiction Biology* 18 (2013) 709-16.

[36] E.D. Kharasch, K.J. Regina, J. Blood, C. Friedel, Methadone Pharmacogenetics: CYP2B6 Polymorphisms Determine Plasma Concentrations, Clearance, and Metabolism, *Anesthesiology* 123 (2015) 1142-53.

[37] H.J. Xie, U. Yasar, S. Lundgren, L. Griskevicius, Y. Terelius, M. Hassan, A. Rane, Role of

polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation, *The pharmacogenomics journal* 3 (2003) 53-61.

[38] H. Xie, L. Griskevicius, L. Stahle, Z. Hassan, U. Yasar, A. Rane, U. Broberg, E. Kimby, M. Hassan, Pharmacogenetics of cyclophosphamide in patients with hematological malignancies, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 27 (2006) 54-61.

[39] M. Nakajima, S. Komagata, Y. Fujiki, Y. Kanada, H. Ebi, K. Itoh, H. Mukai, T. Yokoi, H. Minami, Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the pharmacokinetics/pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients, *Pharmacogenetics and genomics* 17 (2007) 431-45.

[40] F. Haroun, L. Al-Shaar, R.H. Habib, N. El-Saghir, A. Tfayli, A. Bazarbachi, Z. Salem, A. Shamseddine, A. Taher, I. Cascorbi, N.K. Zgheib, Effects of CYP2B6 genetic polymorphisms in patients receiving cyclophosphamide combination chemotherapy for breast cancer, *Cancer chemotherapy and pharmacology* 75 (2015) 207-14.

[41] V. Lamba, J. Lamba, K. Yasuda, S. Strom, J. Davila, M.L. Hancock, J.D. Fackenthal, P.K. Rogan, B. Ring, S.A. Wrighton, E.G. Schuetz, Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307 (2003) 906-22.

[42] J.L. Black, M.R. Litzow, W.J. Hogan, D.J. O'Kane, D.L. Walker, T.G. Lesnick, W.K. Kremers, R. Avula, R.P. Ketterling, Correlation of CYP2B6, CYP2C19, ABCC4 and SOD2 genotype with outcomes in allogeneic blood and marrow transplant patients, *Leukemia research* 36 (2012) 59-66.

[43] V. Bachanova, R. Shanley, F. Malik, L. Chauhan, V. Lamba, D.J. Weisdorf, L.J. Burns, J.K. Lamba, Cytochrome P450 2B6\*5 increases relapse after cyclophosphamide-containing conditioning and autologous transplantation for lymphoma, *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 21 (2015) 944-8.

[44] K. Ilic, R.L. Hawke, R.K. Thirumaran, E.G. Schuetz, J.H. Hull, A.D. Kashuba, P.W. Stewart, C.M. Lindley, M.L. Chen, The influence of sex, ethnicity, and CYP2B6 genotype on bupropion metabolism as an

index of hepatic CYP2B6 activity in humans, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 41 (2013) 575-81.

[45] Y. Li, K.A. Jackson, B. Slon, J.R. Hardy, M. Franco, L. William, P. Poon, J.K. Coller, M.R. Hutchinson, D.C. Currow, A.A. Somogyi, CYP2B6\*6 allele and age substantially reduce steady-state ketamine clearance in chronic pain patients: impact on adverse effects, *British journal of clinical pharmacology* 80 (2015) 276-84.

[46] L.K. Rao, A.M. Flaker, C.C. Friedel, E.D. Kharasch, Role of Cytochrome P450 2B6 Polymorphisms in Ketamine Metabolism and Clearance, *Anesthesiology* 125 (2016) 1103-1112.

[47] H. Ma, W. Zhang, X. Yang, Y. Zhang, S. Wei, H. Zhang, Y. Ma, H. Dang, Effects of Genetic Polymorphisms of CYP2B6 on the Pharmacokinetics of Bupropion and Hydroxybupropion in Healthy Chinese Subjects, *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 24 (2018) 2158-2163.

[48] H. Jinno, T. Tanaka-Kagawa, A. Ohno, Y. Makino, E. Matsushima, N. Hanioka, M. Ando, Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 31 (2003) 398-403.

[49] R. Radloff, A. Gras, U.M. Zanger, C. Masquelier, K. Arumugam, J.C. Karasi, V. Arendt, C. Seguin-Devaux, K. Klein, Novel CYP2B6 enzyme variants in a Rwandese population: functional characterization and assessment of in silico prediction tools, *Human Mutation* 34 (2013) 725-34.

[50] A.L. Crane, K. Klein, U.M. Zanger, J.R. Olson, Effect of CYP2B6\*6 and CYP2C19\*2 genotype on chlorpyrifos metabolism, *Toxicology* 293 (2012) 115-22.

[51] T. Watanabe, K. Sakuyama, T. Sasaki, Y. Ishii, M. Ishikawa, N. Hirasawa, M. Hiratsuka, Functional characterization of 26 CYP2B6 allelic variants (CYP2B6.2-CYP2B6.28, except CYP2B6.22), *Pharmacogenetics and genomics* 20 (2010) 459-62.

[52] M. Honda, Y. Muroi, Y. Tamaki, D. Saigusa, N. Suzuki, Y. Tomioka, Y. Matsubara, A. Oda, N. Hirasawa, M. Hiratsuka, Functional characterization of CYP2B6 allelic variants in demethylation of

antimalarial artemether, Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 39 (2011) 1860-5.

[53] R.K. Mehlotra, M.J. Bockarie, P.A. Zimmerman, CYP2B6 983T>C polymorphism is prevalent in West Africa but absent in Papua New Guinea: implications for HIV/AIDS treatment, British journal of clinical pharmacology 64 (2007) 391-5.

[54] M. Hiratsuka, Y. Hinai, Y. Konno, H. Nozawa, S. Konno, M. Mizugaki, Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2B6 gene in Japanese individuals, Drug metabolism and pharmacokinetics 19 (2004) 155-8.

[55] J. Li, V. Menard, R.L. Benish, R.J. Jurevic, C. Guillemette, M. Stoneking, P.A. Zimmerman, R.K. Mehlotra, Worldwide variation in human drug-metabolism enzyme genes CYP2B6 and UGT2B7: implications for HIV/AIDS treatment, Pharmacogenomics 13 (2012) 555-70.

[56] M. Nagasaki, J. Yasuda, F. Katsuoka, N. Nariiai, K. Kojima, Y. Kawai, Y. Yamaguchi-Kabata, J. Yokozawa, I. Danjoh, S. Saito, Y. Sato, T. Mimori, K. Tsuda, R. Saito, X. Pan, S. Nishikawa, S. Ito, Y. Kuroki, O. Tanabe, N. Fuse, S. Kuriyama, H. Kiyomoto, Rare variant discovery by deep whole-genome sequencing of 1,070 Japanese individuals, Nature Communications 6 (2015) 8018.

[57] B.A. Ward, J.C. Gorski, D.R. Jones, S.D. Hall, D.A. Flockhart, Z. Desta, The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity, The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 306 (2003) 287-300.

[58] Z. Desta, T. Saussele, B. Ward, J. Blievernicht, L. Li, K. Klein, D.A. Flockhart, U.M. Zanger, Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro, Pharmacogenomics 8 (2007) 547-58.

[59] S.L. Mo, Y.H. Liu, W. Duan, M.Q. Wei, J.R. Kanwar, S.F. Zhou, Substrate specificity, regulation, and polymorphism of human cytochrome P450 2B6, Current drug metabolism 10 (2009) 730-53.

[60] E.L. Code, C.L. Crespi, B.W. Penman, F.J. Gonzalez, T.K. Chang, D.J. Waxman, Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation,

Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 25 (1997) 985-93.

[61] S. Ekins, S.A. Wrighton, The role of CYP2B6 in human xenobiotic metabolism, Drug metabolism reviews 31 (1999) 719-54.

[62] 渡邊卓嗣, *CYP2B6* 遺伝子多型によるバリエーション酵素の機能変化に関する研究, 東北薬科大学大学院薬学研究科 2009 年度修士論文 (2009).

[63] 齋藤雄大, *CYP4* 遺伝子多型バリエーション酵素の機能変化に関する研究, 東北大学薬学部薬学科 2013 年度卒業論文 (2013).

[64] A.V. Wells, P. Li, P.M. Champion, S.A. Martinis, S.G. Sligar, Resonance Raman investigations of Escherichia coli-expressed Pseudomonas putida cytochrome P450 and P420, Biochemistry 31 (1992) 4384-93.

[65] M.A. Correia, P.R. Sinclair, F. De Matteis, Cytochrome P450 regulation: the interplay between its heme and apoprotein moieties in synthesis, assembly, repair, and disposal, Drug metabolism reviews 43 (2011) 1-26.

[66] C. Yu, I.C. Gunsalus, Cytochrome P-450cam. III. Removal and replacement of ferriprotoporphyrin IX, The Journal of biological chemistry 249 (1974) 107-10.

[67] J.O. Stern, J. Peisach, A model compound study of the CO-adduct of cytochrome P-450, The Journal of biological chemistry 249 (1974) 7495-8.

[68] S. Modi, W.U. Primrose, L.Y. Lian, G.C. Roberts, Effect of replacement of ferriprotoporphyrin IX in the haem domain of cytochrome P-450 BM-3 on substrate binding and catalytic activity, The Biochemical journal 310 (1995) 939-43.

[69] V.E. Tretiakov, K.N. Degtyarenko, V. Uvarov, A.I. Archakov, Secondary structure and membrane topology of cytochrome P450s, Archives of biochemistry and biophysics 275 (1989) 429-39.

[70] Y. Zhao, J.R. Halpert, Structure-function analysis of cytochromes P450 2B, Biochimica et biophysica acta 1770 (2007) 402-12.

[71] O. Gotoh, Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from

comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences, *The Journal of biological chemistry* 267 (1992) 83-90.

[72] T.L. Domanski, K.M. Schultz, F. Roussel, J.C. Stevens, J.R. Halpert, Structure-function analysis of human cytochrome P-450 2B6 using a novel substrate, site-directed mutagenesis, and molecular modeling, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 290 (1999) 1141-7.

[73] T.L. Poulos, B.C. Finzel, I.C. Gunsalus, G.C. Wagner, J. Kraut, The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450, *The Journal of biological chemistry* 260 (1985) 16122-30.

[74] K.G. Ravichandran, S.S. Boddupalli, C.A. Hasermann, J.A. Peterson, J. Deisenhofer, Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's, *Science* 261 (1993) 731-6.

[75] P.A. Williams, J. Cosme, V. Sridhar, E.F. Johnson, D.E. McRee, Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features, *Journal of inorganic biochemistry* 81 (2000) 183-90.

[76] D.F. Lewis, Homology modelling of human CYP2 family enzymes based on the CYP2C5 crystal structure, *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 32 (2002) 305-23.

[77] C.A. Kemp, J.D. Marechal, M.J. Sutcliffe, Progress in cytochrome P450 active site modeling, *Archives of biochemistry and biophysics* 433 (2005) 361-8.

[78] C. Bathelt, R.D. Schmid, J. Pleiss, Regioselectivity of CYP2B6: homology modeling, molecular dynamics simulation, docking, *Journal of molecular modeling* 8 (2002) 327-35.

[79] M. Spatzenegger, H. Liu, Q. Wang, A. Debarber, D.R. Koop, J.R. Halpert, Analysis of differential substrate selectivities of CYP2B6 and CYP2E1 by site-directed mutagenesis and molecular modeling, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 304 (2003) 477-87.

[80] T.A. Nguyen, M. Tychopoulos, F. Bichat, C. Zimmermann, J.P. Flinois, M. Diry, E. Ahlberg, M. Delaforge, L. Corcos, P. Beaune, P. Dansette, F. Andre, I. de Waziers, Improvement of cyclophosphamide activation by CYP2B6 mutants: from in silico to ex vivo, *Molecular pharmacology* 73 (2008) 1122-33.

[81] R.J. Niu, Q.C. Zheng, J.L. Zhang, H.X. Zhang, Analysis of clinically relevant substrates of CYP2B6 enzyme by computational methods, *Journal of molecular modeling* 17 (2011) 2839-46.



- [82] Y. Sun, W. Zeng, A. Benabbas, X. Ye, I. Denisov, S.G. Sligar, J. Du, J.H. Dawson, P.M. Champion, Investigations of heme ligation and ligand switching in cytochromes p450 and p420, *Biochemistry* 52 (2013) 5941-51.
- [83] S. Yamazaki, K. Sato, K. Suhara, M. Sakaguchi, K. Mihara, T. Omura, Importance of the proline-rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s, *The Journal of Biochemistry* 114 (1993) 652-7.
- [84] B. Kemper, Structural basis for the role in protein folding of conserved proline-rich regions in cytochromes P450, *Toxicology and applied pharmacology* 199 (2004) 305-15.
- [85] M. Imai, H. Shimada, Y. Watanabe, Y. Matsushima-Hibiya, R. Makino, H. Koga, T. Horiuchi, Y. Ishimura, Uncoupling of the cytochrome P-450cam monooxygenase reaction by a single mutation, threonine-252 to alanine or valine: possible role of the hydroxy amino acid in oxygen activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1989) 7823-7.
- [86] M.B. Shah, H.H. Jang, Q. Zhang, C. David Stout, J.R. Halpert, X-ray crystal structure of the cytochrome P450 2B4 active site mutant F297A in complex with clopidogrel: insights into compensatory rearrangements of the binding pocket, *Archives of biochemistry and biophysics* 530 (2013) 64-72.
- [87] K. Kobayashi, O. Takahashi, M. Hiratsuka, N. Yamaotsu, S. Hirono, Y. Watanabe, A. Oda, Evaluation of influence of single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 2B6 on substrate recognition using computational docking and molecular dynamics simulation, *PloS one* 9 (2014) e96789.
- [88] T. Lang, K. Klein, T. Richter, A. Zibat, R. Kerb, M. Eichelbaum, M. Schwab, U.M. Zanger, Multiple novel nonsynonymous CYP2B6 gene polymorphisms in Caucasians: demonstration of phenotypic null alleles, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 311 (2004) 34-43.
- [89] H. Zhang, C. Sridar, C. Kenaan, H. Amunugama, D.P. Ballou, P.F. Hollenberg, Polymorphic variants of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6.4-CYP2B6.9) exhibit altered rates of metabolism for bupropion and efavirenz: a charge-reversal mutation in the K139E variant (CYP2B6.8) impairs formation of a functional cytochrome p450-reductase complex, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 338

(2011) 803-9.

[90] S.C. Gay, M.B. Shah, J.C. Talakad, K. Maekawa, A.G. Roberts, P.R. Wilderman, L. Sun, J.Y. Yang, S.C. Huelga, W.X. Hong, Q. Zhang, C.D. Stout, J.R. Halpert, Crystal structure of a cytochrome P450 2B6 genetic variant in complex with the inhibitor 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 2.0-Å resolution, *Molecular pharmacology* 77 (2010) 529-38.

[91] C.D. Chen, B. Doray, B. Kemper, Efficient assembly of functional cytochrome P450 2C2 requires a spacer sequence between the N-terminal signal anchor and catalytic domains, *The Journal of biological chemistry* 272 (1997) 22891-7.

[92] A. Luthra, M. Gregory, Y.V. Grinkova, I.G. Denisov, S.G. Sligar, Nanodiscs in the studies of membrane-bound cytochrome P450 enzymes, *Methods in molecular biology* 987 (2013) 115-27.

[93] N.N. Bumpus, C. Sridar, U.M. Kent, P.F. Hollenberg, The naturally occurring cytochrome P450 (P450) 2B6 K262R mutant of P450 2B6 exhibits alterations in substrate metabolism and inactivation, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33 (2005) 795-802.

[94] M. Shebley, P.F. Hollenberg, Mutation of a single residue (K262R) in P450 2B6 leads to loss of mechanism-based inactivation by phencyclidine, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35 (2007) 1365-71.

[95] N.N. Bumpus, P.F. Hollenberg, Investigation of the mechanisms underlying the differential effects of the K262R mutation of P450 2B6 on catalytic activity, *Molecular pharmacology* 74 (2008) 990-9.

[96] M.B. Shah, J. Pascual, Q. Zhang, C.D. Stout, J.R. Halpert, Structures of cytochrome P450 2B6 bound to 4-benzylpyridine and 4-(4-nitrobenzyl)pyridine: insight into inhibitor binding and rearrangement of active site side chains, *Molecular pharmacology* 80 (2011) 1047-55.

[97] M.B. Shah, Q. Zhang, J.R. Halpert, Crystal Structure of CYP2B6 in Complex with an Efavirenz Analog, *International journal of molecular sciences* 19 (2018).

[98] H.L. Lin, H. Zhang, M. Jushchyshyn, P.F. Hollenberg, Covalent modification of Thr302 in cytochrome P450 2B1 by the mechanism-based inactivator 4-tert-butylphenylacetylene, *The Journal of pharmacology*

and experimental therapeutics 333 (2010) 663-9.

[99] H.L. Lin, H. Zhang, M.J. Pratt-Hyatt, P.F. Hollenberg, Thr302 is the site for the covalent modification of human cytochrome P450 2B6 leading to mechanism-based inactivation by tert-butylphenylacetylene, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 39 (2011) 2431-9.

[100] T. Lang, K. Klein, J. Fischer, A.K. Nussler, P. Neuhaus, U. Hofmann, M. Eichelbaum, M. Schwab, U.M. Zanger, Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver, *Pharmacogenetics* 11 (2001) 399-415.

[101] M.H. Hofmann, J.K. Blievernicht, K. Klein, T. Saussele, E. Schaeffeler, M. Schwab, U.M. Zanger, Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6\*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 325 (2008) 284-92.

[102] E. Hishinuma, Y. Narita, S. Saito, M. Maekawa, F. Akai, Y. Nakanishi, J. Yasuda, M. Nagasaki, M. Yamamoto, H. Yamaguchi, N. Mano, N. Hirasawa, M. Hiratsuka, Functional characterization of 21 allelic variants of dihydropyrimidine dehydrogenase identified in 1070 Japanese individuals, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 46 (2018) 1083-1090.

[103] T. Omura, R. Sato, The Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *The Journal of biological chemistry* 239 (1964) 2370-8.

[104] F.P. Guengerich, M.V. Martin, C.D. Sohl, Q. Cheng, Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase, *Nature Protocols* 4 (2009) 1245-51.

[105] K. Kaneko, K. Suzuki, Microplate Assay Measurement of Small Amount of P450, *Analytical Letters* 46 (2013) 879-886.

[106] M.A. Morse, J. Lu, High-performance liquid chromatographic method for measurement of cytochrome P450-mediated metabolism of 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin, *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications* 708 (1998) 290-3.

## 発表論文

Functional characterization of 40 CYP2B6 allelic variants by assessing efavirenz 8-hydroxylation.

Takashi Watanabe, Takahiro Saito, Evelyn Marie Gutiérrez Rico, Eiji Hishinuma, Masaki Kumondai, Masamitsu Maekawa, Akifumi Oda, Daisuke Saigusa, Sakae Saito, Jun Yasuda, Masao Nagasaki, Naoko Minegishi, Masayuki Yamamoto, Hiroaki Yamaguchi, Nariyasu Mano, Noriyasu Hirasawa, and Masahiro Hiratsuka.

*Biochemical Pharmacology*, 156 (2018) 420-430.